

# A decorin szerepe a hepatokarcinogenezisben

Doktori értekezés

Készítette:  
**HORVÁTH ZSOLT**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Baghy Kornélia, PhD, tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Lotz Gábor, PhD, egyetemi docens  
Dr. Than Nándor Gábor, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kulka Janina, DSc, egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Pápai Zsuzsanna, PhD, osztályvezető főorvos  
Dr. Rónai Zsolt, PhD, egyetemi adjunktus

Budapest  
2018

## TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék .....	1
Rövidítések jegyzéke .....	4
I. Bevezetés és irodalmi áttekintés .....	7
I. 1. A hepatocelluláris karcinóma .....	7
I. 1. 1. Epidemiológia .....	7
I. 1. 2. A HCC kialakulása és progressziója .....	7
I. 2. Az extracelluláris mátrix .....	11
I. 3. Proteoglikánok osztályozása .....	12
I. 4. A decorin .....	15
I. 5. A HCC és a decorin kapcsolatának kísérletes vizsgálata, modellek .....	19
II. Célkitűzések .....	20
III. Módszerek .....	21
III. 1. Humán rekombináns decorin előállítása .....	21
III. 2. <i>In vitro</i> kísérletek .....	21
III. 2. 1. Proliferációs vizsgálatok .....	22
III. 3. Állatkísérletek .....	23
III. 3. 1. Decorin-null egerek .....	23
III. 3. 2. Kísérletes hepatokarcinogenezis indukálása .....	23
III. 4. Molekuláris vizsgálatok .....	25
III. 4. 1. Real-time PCR .....	25
III. 4. 2. RTK array és Western blot .....	26
III. 4. 3. Decorin és PDGF AB interakciós kísérlet .....	27
III. 5. Morfológiai technikák és egyéb immunológiai módszerek .....	30
III. 5. 1. Immuncitokémia .....	30

III. 5. 2.	Immunhisztokémia.....	30
III. 5. 3.	TGF- $\beta$ 1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .....	31
III. 6.	Statisztikai analízis.....	31
IV.	Eredmények.....	33
IV. 1.	<i>In vitro</i> kísérletek eredményei.....	33
IV. 1. 1.	A decorin gátolja a különböző hepatóma sejtvonalak proliferációját... 33	
IV. 1. 2.	A decorin hatása a jelátviteli útvonalakra hepatóma sejt-specifikus ....	34
IV. 1. 2. 1.	Decorin hatása a TGF- $\beta$ 1 szekrécióra .....	34
IV. 1. 2. 2.	Decorin hatása a jelátviteli folyamatokra az egyes sejtekben .....	35
IV. 1. 2. 2. 1.	A HepG2 sejtvonal.....	36
IV. 1. 2. 2. 2.	A Hep3B sejtvonal .....	39
IV. 1. 2. 2. 3.	A HuH7 sejtvonal .....	42
IV. 1. 2. 2. 4.	A HLE sejtvonal .....	45
IV. 2.	Állatkísérletek eredményei.....	49
IV. 2. 1.	A decorin kvalitatív és kvantitatív változásai a TA és DEN indukált tumorokban.....	49
IV. 2. 2.	A decorin hiánya hajlamosít az indukált májrák kialakulására .....	51
IV. 2. 3.	A decorin hiánya felgyorsítja a sejtciklust.....	53
IV. 2. 4.	A fő szignalizációs útvonalak a HCC-ben, melyek a decorin hiányos állapotban működnek .....	57
IV. 2. 4. 1.	c-Myc változásai .....	57
IV. 2. 4. 2.	A $\beta$ -catenin szerepe .....	59
IV. 2. 4. 3.	Az Akt aktivitása.....	63
IV. 2. 4. 4.	A Glikogén szintáz kináz 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ ) szerepe.....	63
IV. 2. 4. 5.	Az ERK1/2, mint kulcsszereplő .....	64
IV. 2. 4. 6.	Felerősödött receptor aktiváció a decorin hiányos egerekben .....	64
IV. 2. 4. 7.	Decorin kapcsolata a PDGFR $\alpha$ receptorral .....	65
IV. 2. 4. 7. 1.	A decorin hiánya megnövekedett PDGFR $\alpha$ aktivációt eredményez .....	65
IV. 2. 4. 7. 2.	A PDGFR $\alpha$ egészséges májban főleg a nem parenchyma típusú sejtekben lokalizálódik .....	67

IV. 2. 4. 7. 3. Megemelkedett PDGFR $\alpha$ szint, és megjelenése a hepatocitákon TA-kezelés hatására .....	68
IV. 2. 4. 7. 4. A decorin nem kolokalizál a PDGFR $\alpha$ -val, de közvetlenül köti annak természetes ligandját, a PDGF-et .....	70
V. Megbeszélés .....	72
V. 1. <i>In vitro</i> kísérletek eredményei .....	72
V. 2. Állatkísérletek eredményei .....	79
VI. Következtetések .....	91
VII. Összefoglalás .....	92
VIII. Summary .....	93
IX. Irodalomjegyzék .....	94
X. Saját publikációk jegyzéke .....	108
XI. Köszönetnyilvánítás .....	109



## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AFP	alfa foetoprotein
AP4	transzkripciós faktor AP4
BM	bazális membrán
BSA	borjú szérum albumin
CDK	ciklin dependens kináz
CS	chondroitin-szulfát
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DCN	decorin
Dcn <sup>-/-</sup>	decorin hiányos
DEN	dietil-nitrózamin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium; tápfolyadék
DMSO	dimetilszulfoxid
DS	dermatán-szulfát
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ErbB2	Receptor tirozin-protein kináz erbB-2 (erithroblasztóma B2)
ERK 1/2	extracelluláris szignál szabályozott kináz 1/2
FBS	magzati marhaszérum
FZD	Frizzled transzmembrán receptorfehérje
GAG	glükózaminoglikán
GRIP	Glypican-szerű integráns membrán proteoglikán

GS	glutamin szintetáz
GSK3	glikogén szintáz kináz 3
HCC	hepatocelluláris karcinóma
HGF	hepatocita növekedési faktor
HS	heparán-szulfát
IC	immuncitokémia
IGF-IR	inzulin-szerű növekedési faktor 1 receptor
IHC	immunhisztokémia
InsR	inzulin receptor
KS	keratán-szulfát
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz
MSPR	makrofág stimuláló fehérje receptor
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difenil tetrazólium bromid
PBS	foszfát pufferelt sóoldat
PDGF	vérlemezkéből származó növekedési faktor
PKB	protein kináz B
PVDF	polivinilidén fluorid
Rb	retinoblasztóma fehérje
RTK	receptor tirozin kináz
SLIP	Syndecan-szerű integráns membrán proteoglikán
SLRP	small leucine rich proteoglycan; kis leucinban gazdag proteoglikán
TA	tioacetamid
TBS	Tris pufferelt sóoldat

TGFb	transzformáló növekedési faktor béta
VEGFR-2	vaszkuláris-endotheliális növekedési faktor receptor 2
WB	Western blot
WT	wild type; vad típus

## I. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### I. 1. A hepatocelluláris karcinóma

#### *I. 1. 1. Epidemiológia*

A májrákok epidemiológiája összetett, és nehézséget jelent a nagy számú másodlagos daganat elkülönítése a primer tumoroktól. A hepatocelluláris karcinóma (HCC) a leggyakoribb primer májdaganat, de meg kell említeni a jóval ritkább a cholangiokarcinómát, az angiosarkómát illetve a gyermekkori hepatoblasztómát, melyek szintén primer eredetű májtumörök [1].

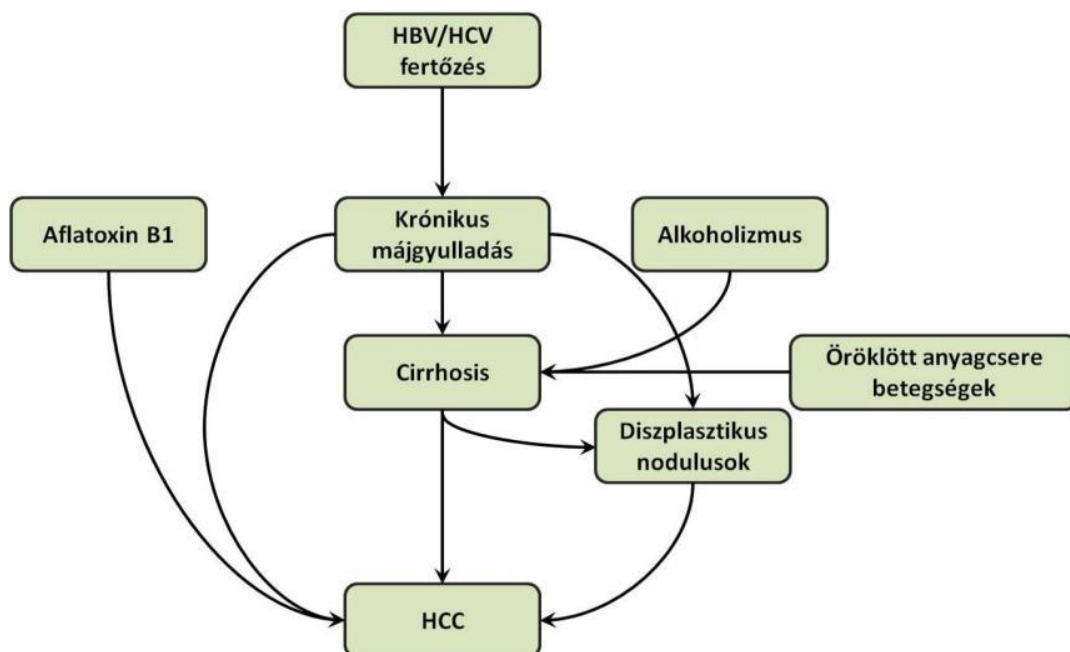
A HCC az 5. leggyakrabban előforduló daganat férfiakban, és a 9. nőkben világszerte. Ez 2012-ben 554 000 új férfi és 228 000 új női esetet jelentett, ez összesen 782 000 új beteg [2]. Az életkorral standardizált előfordulási gyakoriságok a Kelet- és Dél-Kelet ázsiai régióban (több, mint 20/100 000 férfiaknál és több, mint 10/100 000 nőknél; a világ összes májrákjának fele Kínában fordul elő), valamint Közép- és Nyugat-Afrikában (15-20/100 000 férfiaknál és 8-19/100 000 nőknél) kiemelkedően magasak. A fejlett országok esetén (USA, Ausztrália, Nyugat- és Észak-Európa) ezek az értékek 7,5/100 000 alatt maradnak férfiaknál, míg a nők esetében legfeljebb 2,5/100 000. A Kelet-európai régióban, így Magyarországon is közepes előfordulási gyakoriságot figyelhetünk meg (kb. 10/100 000 férfiaknál, és 3/100 000 nőknél) [3, 4]. Az ötéves túlélés 2002-2008 között 15% volt az USA-ban, 2000-2007 között 12% Európában, de ezek a túlélési adatok a fejlődő országokban jóval alacsonyabbak (5% volt megfigyelhető 2002-ben) [4-6].

Rossz prognózisa miatt a HCC okozta elhalálozás a daganatos megbetegedések között a 2. helyen áll; a mortalitás/incidencia arány 0,95. 2012-ben 745 000 halálesetet okozott hepatocelluláris karcinóma (ez az összes daganatos elhalálozás 9,1%-a) [2].

#### *I. 1. 2. A HCC kialakulása és progressziója*

Habár a HCC egy gyorsan progrediáló, halálos kimenetelű betegség, amelynek terápiája mind a mai napig nem kielégítő, megelőzésének elősegítésére számos

információ áll rendelkezésünkre. A tartós HBV vagy HCV hepatitis vírusfertőzés felelős a májrákok háromnegyedéért világszerte, így e fertőzések megelőzése az esetszám csökkentésének egy lehetséges módja. A fertőzés krónikus májgyulladást okoz, amely fokozott regenerációt, és fibrotikus, majd cirrhotikus folyamatokat indukál a májszövetben. Ez olyan diszplasztikus sejtcsoportok (fókuszok, nodulusok) létrejöttét okozza, amelyből később karcinóma alakulhat ki, de a cirrhotikus talajon közvetlenül (nodulusok nélkül) is kifejlődhet a HCC (1. ábra). Azokban az esetekben, ahol nincs vírusfertőzés, a májszövet krónikus károsodása válthatja ki a daganatképződést; alkohol abúzus, vagy direkt genotoxikus szerek, mint az aflatoxin B1, szintén a HCC kialakulását segítik elő (1. ábra). A szakirodalom beszámol további olyan életmóddal járó, illetve öröklött okozati faktorok közreműködéséről is (mint a dohányzás, obesitás, diabétesz vagy fogamzásgátlók használata), amelyeknek ugyancsak szerepük lehet a folyamatban [1].



**1. ábra. A HCC kialakulásának többlépcsős folyamata  
(Wong és Ng nyomán [7])**

A HCC molekuláris szinten igen polimorf betegség [8, 9]. Ezt a komplexitást részben az etiológia, részben a kialakulás mögött meghúzódó szerteágazó patogén folyamatok magyarázzák. A HCC progressziója során számos jelátviteli útvonal és közvetítő

molekula (pl. WNT- $\beta$ -catenin, PI3K / AKT / MTOR, RAS / MAPK, HGF / MET, EGFR, IGF, VEGF és PDGF) működésében figyeltek már meg zavart [9].

A WNT útvonal, amely normális esetben a sejtek differenciációjában, proliferációjában, apoptózisában, valamint az embrionális fejlődés szabályozásában játszik kulcsfontosságú szerepet, ezekkel összefüggésben a tumorigenikus folyamatokban is kiemelt a jelentőséggel bír. A kanonikus Wnt útvonal  $\beta$ -catenin aktivációval jár, amely fehérje aktivált állapotában a sejtmembrán belső felszínéről a sejtmagba transzlokálódik, és ott transzkripciós faktorokkal együttműködve számos olyan túlélést elősegítő gén kifejeződését indukálja, mint a c-myc, cyclin-D, vagy a survivin [10]. Normál sejtekben a  $\beta$ -catenin az E-cadherinnel kapcsolódik a sejtmembrán zonula adherens sejtkapcsolataiban, és köti össze az E-cadherint az aktin citoszkeletonnal [10]. Ha elegendő Wnt ligand halmozódik fel, és mennyiségük meghaladja a szekretált Wnt antagonistákét, úgy a jelátviteli kaszkád extracellulárisan beindul, és a stimulus a Frizzled (FZD) transzmembrán receptoron keresztül bejut az intracelluláris térbe. Az FZD aktivitás felszabadítja a  $\beta$ -catenint az E-cadherinről [11], valamint megakadályozza, hogy a  $\beta$ -catenint az AXIN/APC/GSK3 $\beta$  komplex foszforilálja. Normális esetben, amikor Wnt útvonal nem aktív, a citoplazmatikus  $\beta$ -catenint ez a komplex foszforilálja, és jelöli ki proteaszómás degradációra. Azonban a komplex fehérjeinek mutációja lehetővé teheti, hogy a  $\beta$ -catenin bejusson a sejtmagba, és elősegítse célgénjeinek konstitutív transzkripcióját. A Wnt útvonalat a vastagbélrákokban tanulmányozták a legalaposabban (az APC mutáció okozta vastagbél-tumörök miatt) [12], azonban számos tanulmány számol be az útvonal megnövekedett aktivitásáról HCC-k esetében is, amelyet főleg a  $\beta$ -catenin mutációjának tulajdonítanak [13-15].

Az epidermális növekedési faktor receptor (EGFR) az EGF receptorcsalád tagja, amelyben a ligand megkötését tirozin-kináz aktivitás követi, és amely következőképpen jelátvitelt kezdeményez. Az EGFR olyan transzmembrán fehérje, amely a Wnt útvonalhoz hasonlóan, alapvető biológiai folyamatok szabályozásában vesz részt, beleértve a proliferációt és a túlélést. Mivel számos tumorban termelődik túl az EGFR, az EGFR-antagonisták terápiás felhasználása évtizedek óta része a klinikai gyakorlatnak (ilyen antagonisták például az erlotinib a nem-kissejtes tüdőrákban, vagy a

cetuximab metasztatikus colorectalis adenokarcinóma kezelésében). Az EGFR HCC-ben betöltött szerepéről a rendelkezésre álló adataink szűkösek és inkonzisztensek [9].

Az inzulinszerű növekedési faktor (IGF) család két ligandból (IGF-I és IGF-II), két receptorból (IGFR-I és IGFR-II/M6P) és hat kötő fehérjéből (IGFBP1-6) áll. Az IGF jelátvitel fontos szerepet játszik a magzati fejlődés, a proliferáció, a differenciálódás, a sejtnövekedés és az apoptózis szabályozásában. Mivel a vizsgálatok az IGFBP fehérjék ellentmondásos hatását mutatták ki különböző körülmények között, feltételezhető, hogy kötőfehérjék, és interakciójuk a receptorral a környezeti körülményektől függően eltérő hatásúak lehetnek. Az IGF-II kötődik mind az IGFR-I, mind az IGFR-II/M6P receptorokhoz, de az IGFR-I esetében a kötődés affinitása szignifikánsan alacsonyabb, mint az IGF-I esetében. Az IGF-II gén expressziója rosszindulatú daganatokban a többszörösére növekedhet, beleértve a HCC-t is [9].

A hepatocita növekedési faktor (HGF), amelyet a kötőszöveti csillagsejtek szekretálnak, és amely a c-MET receptorhoz kötődik, a sérülést követő hepatocita regenerációban játszik fontos szerepet. A c-MET és a HGF túlzott expressziója gyakori események a HCC során, amelyek jelentősége a tumor prognózisában még nem tisztázott, további vizsgálatok szükségesek ennek felderítésére [9].

A tirozin kináz receptoroktól downstream a jelátvitel különböző útvonalakon keresztül valósulhat meg, beleértve például a Ras/MAPK, és a PI3K/Akt útvonalakat. A RAS aktivitás egy foszforilációs kaszkádot indít el, amelynek következményeként az ERK transzlokálódik a sejtmagba és jellemzően a sejt számára kedvező (túlélés elősegítő) változásokat idéz elő a génexpresszióban. A RAS mutációi jól ismertek bizonyos rákokban (például a hasnyálmirigyrákban), és nem gyakoriak a HCC-ben, kivéve a vinil-klorid expozíció indukálta HCC-ket [9].

A PI3K/Akt útvonalban az Akt két különböző inger útján is aktiválható (foszforilálható), amelyek mindegyikében szerepel a foszfatidil-inozitol-3,4,5-trifoszfát (PIP3). Az elsőben ligand-receptor kötés eredményez RTK aktivációt, míg a másodikban a folyamatos stimulust a PI3K konstitutív aktivitátsága vagy a PTEN-funkció elvesztése okozza, amely utóbbi a PIP3 szintézis inhibitora. A PTEN egy jól ismert tumorsuppresszor gén, mutációját és/vagy szomatikus delécióját több ráktípusban is kimutatták [9].

Számos tanulmányban elemezték a PTEN szerepét májrákban. A PTEN mutáció gyakorisága meglehetősen alacsony a HCC-ben, szemben más rosszindulatú megbetegedésekkel. Ugyanakkor a heterozigócia vesztes a 10q-ban (itt található a PTEN is) gyakran fordul elő a HCC-kben. Emellett két tanulmány megállapította, hogy a PTEN mRNS szintje szignifikánsan csökkent a HCC-ben a környező cirrhotikus szövetekhez képest [9].

A PI3K egy heterodimer fehérjekomplex, amely egy katalitikus alegységből (p110a, p110b vagy p110g) és egy szabályozó alegységből (p85a, p85b vagy p55g) épül fel. A PIK3CA a p110-et kódolja, és habár gyakran mutálódik humán daganatokban, HCC-re vonatkozóan az adatok ellentmondásosak [9].

Az Akt szerepe a HCC-ban még egyelőre bizonytalan, egy tanulmány azonban arról számolt be, hogy a foszforilált Akt jelenléte HCC resecátumokban 12-szeres fokozta a korai recidíva kockázatát [9].

## I. 2. Az extracelluláris mátrix

Minden szövet és szerv tartalmaz egy nem-sejtes alkotóelemekből felépülő, jól szervezett hálózatot, amelyet extracelluláris mátrixnak nevezünk (ECM). Az ECM nemcsak szöveti szerkezetet biztosít, amelybe az alapszöveti sejtek beágyazódhatnak, de számos olyan sejtleletani folyamatot is szabályozni képes, mint a növekedés, migráció, differenciáció, túlélés, homeosztázis és morfogenezis. Az ECM-et sokféle makromolekula alkotja, amelyek összetétele szövetenként eltérő és specifikus. Fő alkotóelemei olyan rostalkotó fehérjék/makromolekulák, mint a kollagének, az elasztin, a fibronectin, a lamininek, a glikoproteinek, a proteoglikánok és a glükózaminoglikánok. Ezek mind erősen savas és hidratált molekulák. A szerkezetet tekintve az ECM rostjai főleg I. típusú kollagénből, és a jellemzően porcok állományban előforduló II. típusú kollagénből épülnek fel, amelyek más típusú kollagénekkel, egyéb ECM fehérjékkel és proteoglikánokkal összekapcsolódva nagyméretű fibrilláris struktúrákat hoznak létre. Ahogy ezek a rostok egymással és más ECM alkotókkal is összeköttetésbe kerülnek, végül komplex, háromdimenziós hálózatot alakítanak ki [16].



Az ECM nemcsak az említett fiziológias folyamatokban fontos résztvevő, de a malignus fenotípus kialakulásában és a tumorsejtek viselkedésének szabályozásában is nagy jelentősége van. Malignus transzformáció során a tumoros sejteket körülvevő ECM olyan mennyiségi és minőségi változásokon megy keresztül, amelyek megváltoztatják az ECM dinamikus fel- és leépülésének szabályozását. Ez a megváltozott, kóros működés végső soron képes lesz támogatni a daganat fejlődését [17].

A primer hepatocelluláris karcinóma gyakran alakul ki cirrhosis vagy krónikus gyulladás okozta fibrosis talaján, habár a tumor kialakulásának ez nem nélkülözhetetlen feltétele. Előbbiekkel egy időben a folyamat, amely az extracelluláris mátrix fokozott termeléséhez és felhalmozódásához vezet, többféle módon is kedvez a daganatfejlődésnek. Egyrészt a felgyorsult hepatocita regeneráció miatt a DNS hibajavítás mértéke elégtelenné válik, így mutációk halmozódnak fel a májsejtekben [18], másrészt az extracelluláris mátrix kóros átalakulása a szöveti környezetben jelenlévő jelátviteli faktorok mennyiségét, lokalizációját és szerepét is módosítja, tönkretéve ezzel az eredeti, normális funkciót [19].

### I. 3. Proteoglikánok osztályozása

A proteoglikánok olyan fehérje molekulák, amelyekben glükózaminoglikán (GAG) oldalláncok kapcsolódnak kovalensen a központi fehérje vázhoz, és jellemzően a sejtfelszínen, vagy az ECM-ben fordulnak elő. Egyebek mellett az intersticiális mátrix szöveti turgor fenntartásáért felelősek, valamint a bazális membrán „molekuláris szűrőjeként” szokás hivatkozni rájuk [20].

A GAG láncok ismétlődő diszacharid egységekből épülnek fel, amelyek tartalmazznak egy uronsavat és egy acetilált-, vagy szulfatált hexóزامint (ez lehet D-glükózamin, N-acetil-D-glükózamin, vagy N-acetil-D-galaktózamin). Ezen láncok hossza változó, de a fehérjevázhoz kapcsolódó cukorláncok számát meghatározza a kapcsolódási helyek száma, amelyeket a Ser-Gly dipeptid motívumok jelölnek ki. A heparán-szulfát (HS) glükoronsavból és N-acetil-D-glükózaminból, a dermatán-szulfát (DS) glükoronsavból és N-acetil-D-galaktózaminból, a chondroitin-szulfát iduronsavból

és N-acetil-D-galaktózaminból épülnek fel. A keratán-szulfát (KS) uronsav helyett szulfatált galaktózt tartalmaz az N-acetil-glükózamin mellett. A HS lánc D-glükózaminjainak részleges szulfatálása N-acetilált és N-szulfatált régiók váltakozó doménstruktúráját hozza létre. Ez utóbbi növekedési faktorokkal, citokinekkal, növekedési faktor receptorokkal, lipoproteinekkal, vírusokkal, és más makromolekulákkal képes kölcsönhatásba lépni [20].

A proteoglikánokat elsősorban lokalizációjuk alapján szokták osztályozni (1. táblázat). Jellemző, hogy a CS és a DS tartalmú proteoglikánok a kötőszöveti ECM-ben találhatóak (a csontokban, ízületekben és ínakban), míg a HS tartalmúak jelentős része a sejtek felszínén lokalizálódik. Habár jelenleg több, mint 40 proteoglikánt ismerünk, jelentőségük a máj normális működésében és patofiziológiájában csak részben tisztázott.

**1. táblázat. A proteoglikánok osztályozása [20]**

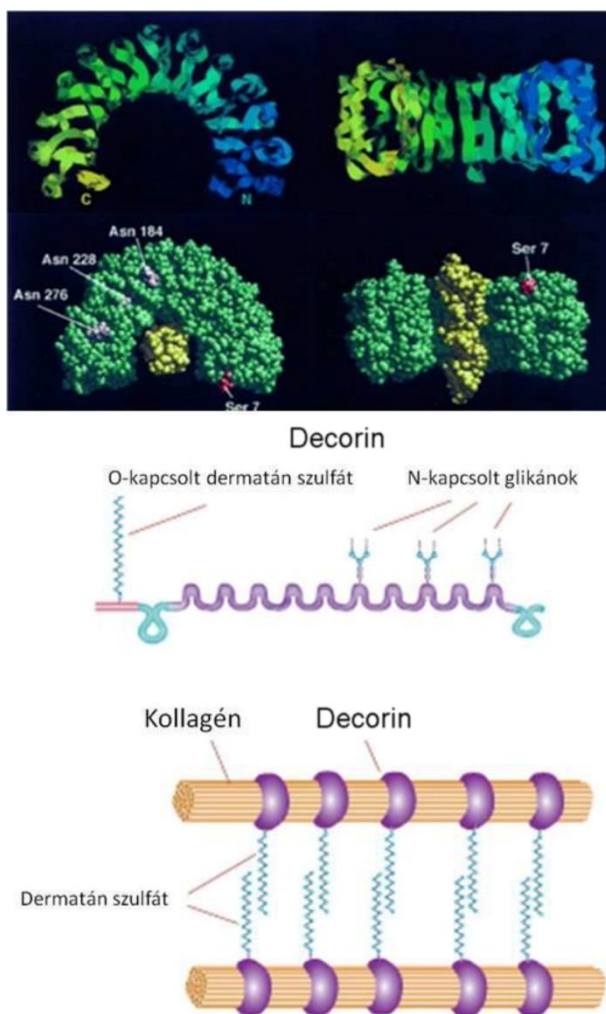
<b>Lokalizáció</b>	<b>Név</b>	<b>Gén jelölés</b>	<b>GAG</b>
Intracelluláris	Serglycin	SRGN	Heparin
Membrán			
SLIP-ek			
	Syndecan-2	SDC1	HS/CS
	Syndecan 2-4	SDC2-4	HS
GRIP-ek			
	Glypican 1-6	GPC1-6	HS/CS
Egyéb			
	Betaglycan	TGFBR3	HS/CS
	CD44	CD44	CS
Extracelluláris			
SLRP-k			
I. osztály			
	Decorin	DCN	DS/CS
	Biglycan	BGN	CS
	Asporin	ASPN	-
II. osztály			
	Fibromodulin	FMOD	KS
	Lumican	LUM	KS
	Keratocan	KERA	KS
	PRELP	PRELP	-
	Osteoadherin	OMD	KS
III. osztály			
	Epiphygan	EPYC	CS/DS
	Osteoglycin	OGN	-
Pericelluláris			
BM zóna			
	Agrin	AGRN	HS
	Kollagén XVIII	COL18A1	HS
	Aggrecan	ACAN	CS/KS
Hyalectan-ok			
	Versican	VCAN	CS
	Neurocan	NCAN	CS
	Brevican	BCAN	CS

Mivel munkám során a decorin funkcióját vizsgáltam a hepatocelluláris karcinómákban, így a bevezető további részében a decorinnal kapcsolatos irodalmi adatokat foglaltam össze.

#### I. 4. A decorin

A decorin a kisméretű, leucin-gazdag proteoglikánok (SLRP) családjába tartozik, amely a benne található 18 génnel és számos splice variánssal a proteoglikánok legnagyobb géncsaládja. A decorin gén emberben a 12-es kromoszómán található meg (12q23). Az SLRP-k minden tagjára, így a decorinra is jellemző a viszonylag kis méretű központi fehérje váz (core protein), amely egy leucin gazdag ismétlődő régiót (leucine rich repeat, LRR) tartalmaz. A proteoglikánokra általánosan jellemző, O-glikozidos kötéssel kapcsolódó GAG oldalláncok közül a decorinban a kondroitin- és a dermatán-szulfát található meg; ezek közül egyszerre csak egyet tartalmaz. A GAG oldalláncok számos olyan molekulát képesek megkötni (például növekedési faktorokat, citokineket), amelyek különféle jelátviteli útvonalak működésében játszanak fontos szerepet, így szabályozni képesek a fiziológiás és tumoros mikrokörnyezetet [21-23] (2. ábra).

A decorin egy 40 kDa-os, patkó alakú fehérje (2. ábra). A váz-fehérje négy doménból áll. Az I. domén egy szignálpeptid szekvenciát és egy propeptid szakaszt tartalmaz. A 16 aminosavas szignálpeptid szerepe a fehérje endoplazmatikus



**2. ábra. A decorin szerkezete és szerepe az ECM-ben (Weber és mtsai nyomán [18]). A decorin a kollagén rostok felszínéhez kötődve azok közt távtartó szerepet tölt be GAG oldalláncai segítségével (további részletek a szövegben).**

retikulumba juttatása, ahol az le is hasad. A 14 aminosavas propeptid a GAG oldalláncok kialakításának szabályozásában vesz részt. Itt található a xilozil-transzferáz enzim kötőhelye, amely ide kapcsolódva képes a Ser4-re (4. szerinre) xilózt kapcsolni.

A II. domén negatívan töltött, 1 db GAG oldalláncot tartalmaz. Az itt található konszenzus szekvencia: As- - As- - X – Ser – Gly. Az As- jelölésűek lehetnek bármilyen negatívan töltött aminosavak, a szerinen történik az O-glikolizáció. Az X helyén bármilyen aminosav szerepelhet. További jellemző része a doménnek egy konzervált, Cys-gazdag régió. Szekvenciája: CX2-3CXCX6-9C. A Cys-ek diszulfid híddal kötöttek.

A III. domén a legnagyobb a négy közül, ez az interakciós domén. Itt található az a 10 db Leu-gazdag tandem ismétlődés is, amelyről az SLRP fehérjecsald a nevét kapta. Konszenzus szekvenciája: LXXLXLXXNXLSXL, ahol L: Leu, Val, Ile; S: Ser, Thr. Az X helyén, az előbbihez hasonlóan, bármilyen aminosav állhat. Ebben a doménben található még az a 3 db Asn, melyekhez N-oligoszacharidok kapcsolódnak, hogy megakadályozzák az önaggregációt.

A IV. domén egy rövid, körülbelül 50 aminosavas szakaszból áll. Az itt található két Cys-t diszulfid híd köti össze. Az így létrejött huroknak a fibrillogenezis szabályozásában van fontos szerepe [22].

A decorint 1986-ban klónozták először [24] fibroblast cDNS könyvtárból, ekkor még PG40, illetve 'small proteoglycan II' neven neveztek, így található meg az irodalomban. A decorin nevet, amely aztán az általánosan ismert és elfogadott elnevezéssé vált, 1988-ban kapta [25]. Az elnevezés arra utal, hogy a decorin kollagén rostokhoz kapcsolódva azok felszínét „dekorálja”. Klasszikus funkcióját tekintve az I és III típusú kollagénekhez kötődve, azok elhelyezkedését, egymáshoz viszonyított távolságát, végső soron az ECM kollagén rostjainak érését befolyásolja (2. ábra). A GAG oldalláncok biztosítják rostok közötti távolságot [26]. Ennek megfelelően, a decorin hiányos (decorin knock-out; *Dcn*<sup>-/-</sup>) egereknél abnormális kollagén szerveződést tapasztaltak, amelynek leglátványosabb fenotípusos következménye az állatok bőrének extrém fragilitása [27]. Mivel a decorin hiányos állatok életképesek, számos olyan kísérlet alanyai voltak az utóbbi években, amelyekben igazolták, hogy a decorin fontos szerepet játszik a cornea áttetszőségének kialakításában [28], az ínszalagok fejlődésében [29], a sebgyógyulásban [30], a dentin mineralizációban [31], az angiogenezisben [30,

32], a gyulladásos folyamatokban [33], valamint a májfibrosisban [34] és számos egyéb egyedfejlődési, fiziológiai, és tumoros szabályozási folyamatban.

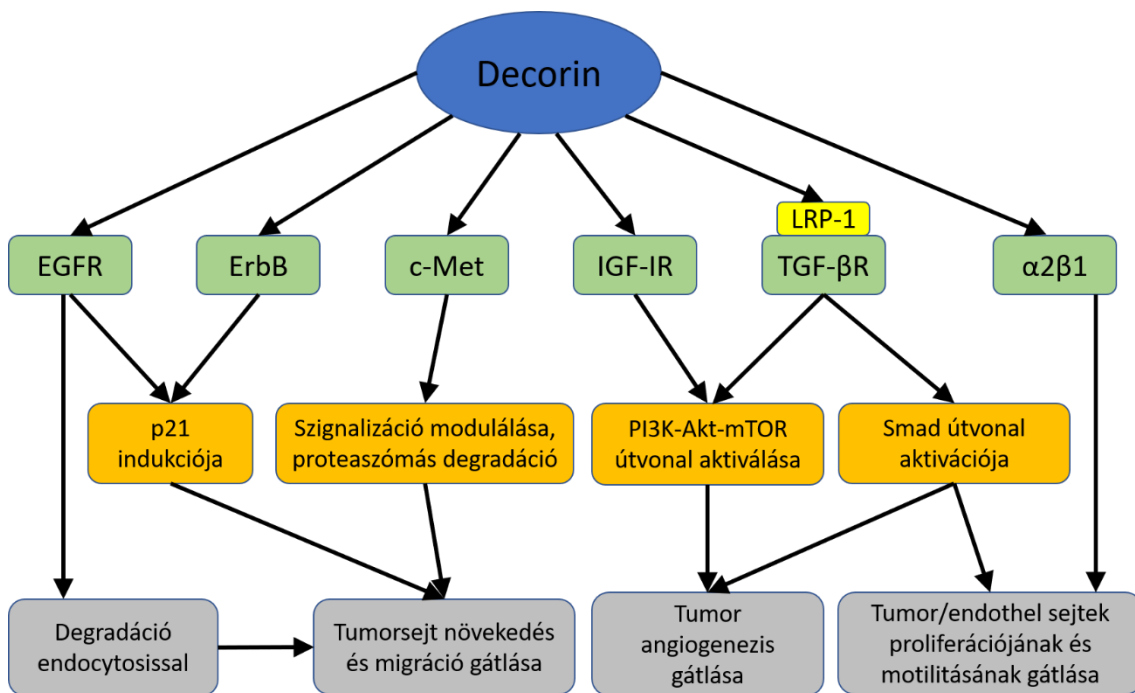
A fenti felsorolásnak megfelelően, az utóbbi évtizedek vizsgálatai igazolták, hogy a decorin számos jelátviteli útvonalban vesz részt, és jellemzően anti-tumorigenikus hatása is van. Sőt, 2012-ben már a „mátrix őrmolekulájaként” említik analógiában a p53-mal, amely a „genom őre” [35].

Számos bizonyíték támasztja alá annak tényét, hogy a decorin potens tumorelles molekula [36, 37]. Az első tanulmányok, amelyeket decorin hiányos egereken végeztek, igazolták, hogy habár a decorin hiánya spontán tumorok megjelenését nem okozza [27], a tumorképződést nagymértékben elősegíti [38]. A későbbiekben azonban kimutatták, hogy a decorin-deficiens C57Bl/6 egerek hajlamosak bélrendszeri daganatok kialakítására, különösen, ha 'nyugati-típusú', magas kalóriatartalmú étrenden tartják őket [39, 40]. Továbbá, a decorin ektopikus expressziója általános tumornövekedés gátlást okozott különféle szöveti eredetű neoplasztikus sejteknél [41]. Ezen megfigyelések következményeként számos további tanulmány igazolta a decorin tumorelles, és anti-metasztatikus hatását [42-47]. A decorin expressziója neoplasztikus szövetekben viszonylag kevésbé feltárt terület, annak ellenére, hogy számos publikáció foglalkozik a decorin hatásával *in vitro* sejtvonalas kísérletekben, és xenograft modellekben [48-51].

A decorin volt az első proteoglikán, amelyről kimutatták, hogy közvetlenül szabályozza a sejtnövekedést. A decorin képes megkötni és ezzel blokkolni a TGF $\beta$  növekedési faktort kínai hörcsög ovárium sejtekben (CHO), ezzel gátolva a sejtek növekedését. [52]. Azonban kiderült, hogy mivel a legtöbb malignus sejt növekedése nem függ a TGF $\beta$ -tól, más szignalizációs mechanizmusoknak is részt kell vennie a decorin tumor szuppresszív hatásának kialakításában. EGF receptort túltermelő, A431 laphám karcinóma sejtekben az exogén decorin, illetve annak core fehérjéje aktiválja az EGFR-t, és növekedésgátlást indukál a p21<sup>WAF1/KIP1</sup> ciklin-függő kináz gátló expresszió megemelkedésével [53-55]. Azon túl, hogy képes a receptorhoz kapcsolódni, akadályozva ezzel a természetes ligand bekötődését, olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, amelyek az imént említett inhibíciót kiváltják. A decorin-EGFR interakció másik következménye a receptor caveolin mediált internalizációja és degradációja [56]. Kísérletesen igazolták, hogy a decorin core fehérjéje képes kapcsolódni olyan további

receptorokhoz, mint az IGF-IR [57], az ErbB2 [48], a Met (HGF receptor) [58], a TGF $\beta$ R (LRP-1-en keresztül [59]) és az  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin [60].

A decorin hiánya a tumorstrómából korrelál a rosszabb túléléssel invazív emlődaganatos betegeknél [47]. Emellett számos daganat strómájában jelentősen lecsökken a decorin mennyisége [61], így a hólyagrákok esetében is, ahol a normál hólyagstrómában egyébként a decorin nagy mennyiségben van jelen [62]. Ugyanakkor a szolubilis decorin szisztémás bejuttatása a szervezetbe (pl.: adenovírus segítségével) számos szolid tumor esetében szignifikáns módon csökkenti a neoangienezist [49, 63, 64]. A decorin és p53 kettős mutáns egerek (DCN $^{-/-}$ ; TP53 $^{-/-}$ ) jóval korábban elpusztulnak a bennük kialakuló agresszív T-sejtes limfómában, mint a csak p53 mutációt hordozó társaik [38].



**3. ábra. Decorin ismert célpontjai és a szabályozásra gyakorolt hatása a daganatokban (Bi és Yang nyomán [65]).** A decorin képes közvetlenül sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódni, amelyeken keresztül olyan jelátviteli utakat indukál, melyek összességében a tumorsejtek proliferációjának gátlását fogják előidézni.

**További részletek a szövegben.**

Ezek a megfigyelések a decorin tumorszupresszor szerepét igazolják, és ennek megfelelően potenciális terápiás faktorként is érdemes lehet rá tekinteni, amely akár önmagában, akár kemoterápiás szerekkel kombinálva gátolhatja a tumorprogressziót és a metasztázist [66].

## I. 5.A HCC és a decorin kapcsolatának kísérletes vizsgálata, modellek

A fiziológiás és genetikai hasonlóságok, amelyek az ember és a rágcsálók közt fennállnak, valamint a rövid élettartam, a könnyű és magas kapacitású szaporítás miatt a patkányok és az egerek a rákkutatás kedvelt kísérleti modellállatai [67]. Saját vizsgálatainkban kémiai úton indukáltunk primer májrákot egerekben, tioacetamid (TA) és dietil-nitrózamin (DEN) használatával. A tioacetamid egy promóter típusú molekula, amely fibrosis-t indukál, majd a máj hyper-regenerációja következtében, cirrhotikus talajon kialakul a májdaganat [68, 69]. Mivel a humán HCC-k 70%-a cirrhosis következtében alakul ki, a modell kiválóan felhasználható a humán vonatkozása miatt is. Ezzel szemben, a dietil-nitrózamin közvetlen DNS mutagén hatása miatt anélkül képes a májdaganat előidézésére, hogy a fibrotikus átalakulásra szükség volna [67].

Az állatkísérletek mellett, a jelátviteli folyamatok és az egyes molekulák közti interakciók alaposabb feltérképezésére az *in vitro* módszerek állnak rendelkezésre. A szövettényészeti vizsgálatokra felhasználható HCC sejtvonalak száma legalább 25 a Cancer Cell Line Encyclopedia adatbázisa szerint [70], és ezek közül néhány sejtvonal már jelentős szakirodalmi háttérrel tudhat magáénak. Mi a HepG2, Hep3B, HuH7 és HLE sejtvonalakat választottuk ki vizsgálataink tárgyának.

Munkacsoportunk korábban vizsgálta a decorin szerepét a májfibrosis regenerációjában [34], és kapcsolatát a TGF $\beta$ -val fibrosis, és májcirrhosis során [71], de a decorin hatását a hepatocelluláris karcinóma kialakulásában és fejlődésében eddig még nem tárták fel. Ennek megfelelően egyrészt a már említett hepatóma sejtvonalakon végeztünk *in vitro* vizsgálatokat, amelyekben a sejteket exogén humán rekombináns decorinnal kezeltük, másrészt vad típusú, valamint decorin hiányos (Dcn<sup>-/-</sup>) egerekben indukáltunk májdaganatokat *in vivo*, ezzel vizsgálva a decorin szerepét a hepatokarcinogenezisben.



## II. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori értekezésemhez az alábbi célokat tűztük ki:

1. Annak felderítése, képes-e a humán rekombináns decorin kezelés gátolni a hepatocelluláris karcinóma sejtvonalak proliferációját.
2. Kísérletes hepatokarcinogenezisben vizsgálni a decorin szerepét vad típusú és decorin hiányos ( $Dcn^{-/-}$ ) egerek összehasonlítása nyomán
3. A megfigyelt hatások kiváltásáért felelős, feltételezett jelátviteli útvonalak feltérképezése, a résztvevő molekulák mennyiségi és minőségi változásainak kimutatása, valamint további lehetséges targetek azonosítása
4. Átfogó képet kapni a decorin szerepéről a hepatokarcinogenezisben.

### III. MÓDSZEREK

#### III. 1. Humán rekombináns decorin előállítás

A humán rekombináns decorin megtermeléséhez olyan pCMV expressziós vektort használtunk, amely tartalmazta a humán decorin cDNS szekvenciáját (a konstrukció létrehozását Dr. Szilák Lászlónak köszönhetjük). Ehhez CHO-S sejteket (Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) transzfektáltunk az expressziós vektorral, Neon™ transzfekciós készülék használatával, elektroporációs technikával, a gyártói javaslat szerint (Invitrogen/Thermo Fisher). A sikeresen transzfektált sejteket 500 µg/ml G418 antibiotikummal (Sigma-Aldrich; St. Luis, MO) szelektáltuk, majd a humán rekombináns decorint a sejteket forgalmazó cég ajánlása szerint termeltettük.

Ezután, a korábbi leírásoknak megfelelően [72] a proteoglikánt anioncserélő kromatográfia segítségével izoláltuk a CHO sejtek tápfolyadékából. A kromatográfiás tisztítás után a decorint is tartalmazó oldatban lévő magas NaCl- és karbamidkoncentráció csökkentése érdekében a mintákat dializáltuk desztillált vízzel szemben, 4 °C-on. Végül a decorin koncentrációját dimetil-metilénkékkel (DMMB, Sigma-Aldrich) történő festéssel, spektrofotometriás méréssel, 525 nm-en megmértük, majd a további felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Az *in vitro* kísérletekben 10x PBS-t a vízben lévő decorin törzsoldathoz, hogy végül 1x PBS-ben legyen feloldva, majd 1x PBS-sel a kívánt koncentrációra hígítottuk a felhasználásra kerülő oldatokat.

#### III. 2. *In vitro* kísérletek

A HepG2, Hep3B sejtvonalakat az ATCC-től (ATCC HB-8064, és ATCC HB-8065, American type culture collection; Manassas, VA) szereztük be, a HuH7 és HLE sejtvonalak a japán sejtbankban voltak hozzáférhetőek (JCRB0403 és JCRB0404, Japanese Collection of Research Biosources Cell Bank; Osaka, Japán).

A sejteket 1000 mg/L (5,5mmol/L) glükóz tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich) tápfolyadékban tenyésztettük, amelyet 10% [v/v] FBS-sel (Sigma-Aldrich) és 1% [v/v] antibiotikum (Penicillin/StreptoMycin; Sigma-

Aldrich) koncentráció mellett. A sejtek számára ideális tenyésztési körülményeket biztosítottunk (5% szén-dioxid koncentrációs atmoszféra és a 37 °C).

A decorint 50 és 100 µg/ml (DCN50 és DCN100 csoportok) koncentrációban adtuk a sejtekhez 24 órás szérumban deprivációt követően (0% [v/v] szérumban). A szérumbanbevezetés után a sejteket 0, 24, 48 és 72 órán keresztül inkubáltuk a különböző decorin kezelések mellett (továbbra is szérumbanmentes tápfolyadékban), 96-os plate-ekben a proliferációs vizsgálatokhoz, illetve 48 órán keresztül T25-os tenyésztőflaskákban és 6-os plate-ekben a további molekuláris vizsgálatokhoz.

### *III. 2. 1. Proliferációs vizsgálatok*

A sejtek proliferációját 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2, 5-difenil tetrazólium bromid (MTT) assay (Sigma-Aldrich) segítségével vizsgáltuk. A kísérleteket ezekben az esetekben 96 lyukú szövettenyésztő plate-eken végeztük, a következő kezdeti sejtszámokat alkalmazva:  $2 \times 10^3$  sejt/well HepG2 és HLE, illetve  $5 \times 10^3$  sejt/well Hep3B és HuH7. A sejtek letapadását követően, 24 órás szérumbanbevezetés után hozzáadtuk a tápfolyadékhoz a decorint 0, 50 és 100 µg/ml decorin végkoncentrációkat elérve. Az egyes well-ek így végül 180 µl szérumbanmentes médiumot és 20 µl PBS-t tartalmaztak, amely PBS-ben a decorint oldottuk a megfelelő koncentrációkban (0, 500 és 1000 µg/ml decorin), a kívánt végkoncentráció elérése érdekében. Az idő függő vizsgálatokban (0, 24, 38, 72 h) 8 párhuzamos méréssel dolgoztunk és legalább 3 független kísérletet végeztünk. Az egyes időpontoknál a sejtek proliferációját (MTT esetén tulajdonképpen inkább a sejtek viabilitását) a well-ekhez történő 20 µl MTT oldat hozzáadásával vizsgáltuk; 4 óra 37 °C-os inkubációt követően, a sejtek által képzett formazán kristályokat 150 µl DMSO-ban oldottuk vissza. A plate-eket 1 percig rázattuk, majd az optikai denzitást multiwell spektrofotométerben mértük 570 nm-en (Labsystems Multiskan MS).

### III. 3. Állatkísérletek

Minden állatkísérlet az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács jóváhagyásával, és az állatkísérletekről szóló, hatályban lévő 40/2013. (II. 14.) Korm. rendelet 45. § (4) bekezdésével összhangban került kivitelezésre; engedélyszám: XVI/03047-2/2008.

#### III. 3. 1. *Decorin-null egerek*

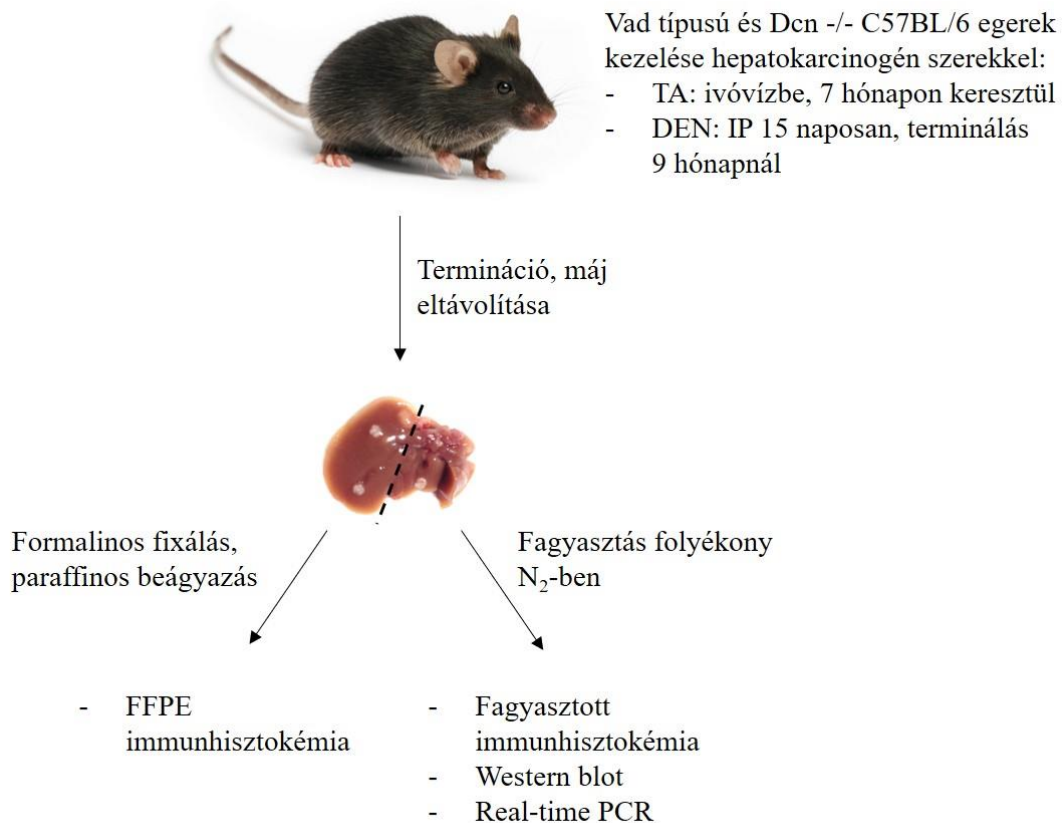
A decorin-deficiens egerek létrehozását már korábban leírták [27]. Röviden összefoglalva; a decorin gén 2 exonjába célzott módon egy PGK-Neo kazettát építettek, melytől a működésképtelenné tette. Az indukált mutációt hordozó, heterozigóta C57Bl/6 nőstény és hím egereket addig kereszteztük, amíg a homozigóta állapotot el nem értük. Az újszülött állatok genotípusát PCR segítségével ellenőriztük. Ehhez egérfarokból izoláltunk DNS-t. A PCR-t 3 primer segítségével végeztük el, szenz és antiszenz primerekkel, amelyek a decorin 2 exonjára voltak specifikusak, illetve egy a PGK-Neo kazettára volt illeszkedő. A PCR termékeket 2%-os agaróz gélen futtatva ellenőriztük és értékeljük [27].

#### III. 3. 2. *Kísérletes hepatokarcinogenezis indukálása*

A cirrhotikus talajon kialakuló májdaganat kísérletes indukálásához egy hónapos C57Bl/6 hím egereket használtunk. 15 vad típusú, és 15 *Dcn*<sup>-/-</sup> állatot kezeltünk az ivóvizükben oldott tioacetamiddal (TA) (150 mg/l-es koncentrációban), amelyet az egerek 7 hónapon keresztül kaptak. Kontroll csoportoknak a kezelt állatokkal egyidős, kezeletlen, azonos genetikai háttérrel rendelkező egereket használtunk. Az egereket a 7 hónap leteltével, éteres altatásban végzett cervicalis diszlokációval termináltuk.

A nem cirrhotikus hepatokarcinogenezis vizsgálatához a 15 napos egerek egyszeri, nagy dózisú dietil-nitrózamin (DEN; 15 µg/testtömeg gramm) intraperitoneális injekciójával indukáltunk daganatokat. A kísérlet végén 10 vad típusú és 10 *Dcn*<sup>-/-</sup> egeret, és 5-5 kezeletlen kontroll állatot használtunk fel. A hepatocelluláris karcinóma az injekciót követő 9. hónapban jelent meg az állatokban.

Az állatok testtömegét, májtömegét és a máj felszínén látható, makroszkóposan megszámolható tumorszámot mértük és regisztráltuk a termináció során. Az eltávolított egyes májak egyik felét folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd -80 °C-on tároltuk, míg a májak másik felét 10%-os formaldehyd oldatban fixáltuk, és paraffinba ágyaztuk (4. ábra). A fagyasztott minták szolgáltak a fagyasztott metszetek, a fehérje-, és az RNS minták alapjául a további vizsgálataink során, míg a formalin fixált, paraffinba ágyazott mintákból készült szövettani metszeteket vagy hematoxin-eozin (HE) festést, vagy immunhisztokémiai festéseket követő morfológiai vizsgálatokban használtuk fel. A tumorok térfogatának meghatározásához a HE festett metszeteket Panoramic Scan készülékkel (3D Hitech Ltd., Budapest, Hungary) beszkenneltük, majd a daganatok hosszát és szélességét a Pannoramic viewer program (3D Hitech Ltd.) segítségével határoztuk meg. A tumor térfogatot az alábbi képlet alapján számoltuk ki:  $V = (\text{szélesség (mm)}^2 \times \text{hossz (mm)} \cdot \pi) / 6$ .



**4. ábra: Az állatkísérletek metodikája, az állatkísérletes vizsgálati minták létrehozása**

### III. 4. Molekuláris vizsgálatok

#### III. 4. 1. Real-time PCR

Az RNS-t a fagyaszott májszövetből és a TRI reagensben felvett sejtekből izoláltuk. Májszövet esetén folyékony nitrogénben történő szövetporítást követően a teljes szöveti RNS-t RNeasyMini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) segítségével tisztítottuk ki, a gyártói leírásnak megfelelően. A kinyert RNS mennyiségét és tisztaságát ND-1000 spektrofotométerrel határoztuk meg (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Az RNS integritását és méretbeli eloszlását Experion RNA Chip-ek segítségével, Experion Automated Electrophoresis Station készüléken vizsgáltuk (Bio-Rad, Hercules, CA). Az *in vitro* kísérletekből származó sejtekből a TRI reagens (Sigma-Aldrich) gyártói utasításai szerint izoláltuk az RNS-t. Komplement DNS-t (cDNS) az M-MLV Reverse Transcriptase kit (Invitrogen/Thermo Fisher) segítségével készítettünk 1 µg tisztított RNS-ből. A real-time PCR-t az ABI Prism 7000 Sequence Detection System, illetve StepOne Plus készüléken végeztük el (Applied Biosystems/Thermo Fisher) az alábbi egér célgéneket vizsgálva (TaqMan Gene Expression Assays):

- p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (CDKN1A, Assay ID: Mm00432448\_m1)
- AP4 (Assay ID: Mm00473137\_m1)
- glutamine synthetase (Assay ID: Mm00725701\_s1)
- AFP (Mm00431715\_m1)
- endogén kontrollnak: 18S rRNS (Part No. 4319413E)

Minden mintát triplikátumban vizsgáltunk 96 lyukú PCR plate-n. Egy reakció végtérfogata 20 µl volt, amelybe 50 ng cDNS-t mértünk és TaqMan Universal PCR MasterMix-et (Part No. 4324018, Applied Biosystems by Life Technologies) használtunk fel. A PCR reakció hőmérséklet beállításai a következők voltak:

- denaturáció, 95 °C, 10 perc, 1x
- amplifikáció (40x):
  - o denaturáció, 95 °C, 15 másodperc
  - o annealáció: 60 °C, 1 perc

Az eredményeket C<sub>T</sub> értékekben kifejezve kaptuk, a relatív expressziót a 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> módszerrel számoltuk ki.

### III. 4. 2. *RTK array és Western blot*

A 48 órás kezelést követően a sejteket a T25-ös tenyésztőflaskákból sejtkaparóval, 1 ml lízispufferben gyűjtöttük össze (20 mM TRIS pH 7,5, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton-X100, 0,5% Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich) 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF). A mintákat szonikátorral homogenizáltuk, majd 30 percig jégen inkubáltuk. Fagyasztott szövetminták esetén folyékony nitrogénben, fagyasztva porítással történt a homogenizálás. Ezután 15 000 g-n, 5 perc centrifugálás után (szöveti minták esetén 20 perc), a felülúszóban Bradford protein assay segítségével (Bio-Rad) spektrofotometriásan, 595 nm-en fehérjekoncentrációt mértünk.

A tirozin kináz receptorok aktivitásának méréséhez a receptorok relatív foszforiláltságát vizsgáltuk Proteome Profiler Array segítségével (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), a gyártói instrukciók mentén. Mintától és vizsgálatról függően, a gyártói ajánlásnak megfelelően 200-300 µg összfehérjét adtunk minden egyes foszfo-RTK membránhoz. A szignálok előhívásához SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit-et használtunk (Pierce/Thermo Fisher), majd az így kapott kemilumineszcens jeleket a Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System készülékkel rögzítettük.

Western blot vizsgálatokban 20 µg összfehérjét (1,5 v/v% β-mercaptoetanol mellett denaturálva, 99 °C, 5 perc) 10%-os, SDS-t tartalmazó poliakrilamid gélen választottunk el (200 V, 30 perc), Mini Protean elektroforézis készülékben (Bio-Rad), majd ugyancsak Bio-Rad készüléken PVDF membránra (Merck Millipore, Burlington, MA) blottoltuk (75 mA, 4 °C, 16 h).

Ponceau festéssel állapítottuk meg a blottolás hatékonyságát. Egy órás, 5 w/v% tejporos blokkolást követően (Nonfat dry milk TBS-ben oldva (Bio-Rad)) a membránokat 16 órán át, 4 °C-on inkubáltuk a megfelelő elsődleges ellenanyagokkal. β-actin immunjelölést alkalmaztunk, mint betöltési (loading) kontroll. A membránokat 0,05 v/v% Tween-20-t tartalmazó TBS-sel mostuk 5 alkalommal, 5 percig, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagot adtunk a mintákhoz 1 órára. Az előzőekben is alkalmazott, 5x5 perc mosást követően, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit-tel (Pierce/Thermo Scientific) hívtuk elő a membránokat, a jeleket a

Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System készülékkel detektáltuk. Az alkalmazott ellenanyagok listája a megfelelő hígításokkal a 2. táblázatban található meg.

### *III. 4. 3. Decorin és PDGF AB interakciós kísérlet*

Az általunk előállított humán rekombináns decorint nitrocellulóz membránon immobilizáltuk dot blot készülék segítségével (Millipore), kb. 2 µg/well mennyiségben az első wellekben, majd felező hígítási sorban. A nitrocellulóz membránt a kísérletnek megfelelő módon vágtuk szét több, kisebb membránra. Ezt követően a membránokat 3% w/v tejpor oldattal (Nonfat dry milk TBS-ben oldva; Bio-Rad) blokkoltuk, majd 4 µg/ml PDGF AB-val (TBS-ben; ab73228; AbCam) 16 órán át, 4 °C-on inkubáltuk a megfelelő membránokat. Mosást követően anti-PDGF AB elsődleges ellenanyaggal inkubáltuk (ab73228; AbCam) 16 órán át, 4 °C-on. Végül HRP-konjugált másodlagos ellenanyagot adtunk a membránokhoz 1 órára, és SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit-tel (Pierce/Thermo Scientific) hívtuk elő őket. A szignálok rögzítését és értékelését a Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System készülékkel végeztük.



**2. táblázat. A WB, dot blot és IHC vizsgálatokban felhasznált ellenanyagok**

Antigén specifikáció	Típus	Gyártó*	Katalógus szám	Hígítás IHC-hez / IC-hez	Hígítás WB-hoz / Dot blothoz
Decorin	Kecske poliklonális	R&D Systems	AF 1060	F: 1:50	1:500
$\beta$ -actin	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	4967s	-	1:2000
c-Myc	Nyúl poliklonális	Abnova	PAB 18101	P: 1:50	1:500
Foszfo-c-Myc (Thr58)	Nyúl poliklonális	Thermo Fisher	PA1-14268	P: 1:50	1:1000
p44/42 MAP Kinase	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	9102	-	1:1000
Foszfo-p44/42 MAP Kináz (Thr202/204)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	4370	-	1:1000
$\beta$ -Catenin	Nyúl poliklonális	Atlas Antibodies	HPA-029159	P: 1:50	1:1000
Foszfo- $\beta$ -Catenin (Ser33/34/Thr41)	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	9561	-	1:1000
p21 <sup>Waf1/Cip1</sup>	Nyúl poliklonális	Abcam	ab7960	P: 1:50	1:200
p27 <sup>Kip1</sup>	Egér monoklonális	Biosource	AHZ0458	-	1:1000
Pan-Akt	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	4691	-	1:1000
Foszfo-Akt (Thr308)	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	2965	-	1:500
GSK3 $\beta$	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	9315	-	1:1000
Foszfo-GSK3 $\alpha/\beta$ (Ser21/9)	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	9331	-	1:1000
Foszfo-Rb (Ser780)	Nyúl poliklonális	Cell Signaling	9307	-	1:500
Foszfo-Rb (Thr821)	Nyúl poliklonális	Sigma-Aldrich	R4153	-	1:500
Foszfo-CDK1 (Tyr9)	Nyúl poliklonális	Novus	nbp1-19966	-	1:500
PDGFR $\alpha$	Kecske poliklonális	R&D Systems	RD-AF1062	-	1:1000
PDGFR $\alpha$	Nyúl monoklonális	Cell Signaling	3174	1:50	-

PDGF AB	Kecske poliklonális	Abcam	ab50201	-	1:500
p-Y	Egér monoklonális	R&D Systems	RD-MAB1676	1:50	1:1000
Másodlagos ellenanyagok	Típus	Gyártó*	Katalógus szám	Hígítás IHC- hez / IC-hez	Hígítás WB-hoz / Dot blothoz
Anti-nyúl immunglobulin/HRP	Kecske poliklonális	DakoCytomation	P 0448	1:200	1:2000
Anti-kecske immunglobulin/HRP	Nyúl poliklonális	DakoCytomation	P 0449	-	1:2000
Anti-nyúl immunglobulin/biotin	Kecske poliklonális	DakoCytomation	E 0432	1:200	-
Alexa Fluor 488 anti- kecske IgG	Szamár	Invitrogen	A-11055	1:200	-
Alexa Fluor 555 anti- nyúl IgG	Szamár	Invitrogen	A-31572	1:200	-

\* R&D Systems Minneapolis, MN, DakoCytomation Glostrup Denmark, Invitrogen/Life Technologies Carlsbad CA, Abcam Cambridge UK, Cell Signaling Technology Danvers, MA, Abnova Taipei Taiwan, Thermo Fisher Rockford IL, Atlas Antibodies Stockholm Sweden, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, Calbiochem/Millipore Billerica MA.

### III. 5. Morfológiai technikák és egyéb immunológiai módszerek

#### III. 5. 1. *Immuncitokémia*

A sejteket 6 lyukú plate-ben tenyésztettük, steril üveg fedőlemezre növesztettük, majd 24 órás szérum éheztetést követően 48 órán át kezeltük őket 0, 50 és 100 µg/ml decorinnal, (lásd korábban). A kísérlet végén a sejteket hideg, tömény metanollal fixáltuk (-20°C, 10 perc). A fedőlemezeket 0,05% Tween 20 tartalmú PBS-sel (PBST) mostuk, az aspecifikus kötőhelyeket 5% szérum albuminnal (BSA) blokkoltuk (PBS-ben oldva, Sigma-Aldrich). A sejteket 16 órán át 4°C inkubáltuk a megfelelő elsődleges ellenanyagokkal. Ezt követően a sejteket tartalmazó fedőlemezeket 5x5 percig mostuk PBST-vel, majd megfelelő fluoreszcens másodlagos ellenanyaggal (lásd 2. táblázat) és 4'-6'-diamidino-fenilindol-lal (DAPI, 1:200, D8417, Sigma-Aldrich) inkubáltuk egy órán át, szobahőmérsékleten. Az utolsó mosási lépés után fluoreszcens fedőanyaggal (Dako, Glostrup, Denmark) fedtük a mintákat és rögzítettük őket a tárgylemezeken. Az értékeléshez epifluoreszcens mikroszkópot (Nikon Eclipse E600) használtunk.

#### III. 5. 2. *Immunhisztokémia*

A formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket xilollal, majd leszálló alkoholsorral, végül 5 perc dH<sub>2</sub>O-ban történő inkubálással rehidráltuk. Az antigén feltárást kuktában, magas hőmérsékleten és nyomáson végeztük, TRIS-EDTA puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, 0,05% Tween 20, pH 9) jelenlétében, 20 percig. A lehűlést követően 0,05% Tween 20 tartalmú PBS-sel (PBST) mostuk a metszeteket, 3x5 percig. Ezután blokkoltuk az endogén peroxidáz aktivitást 10%-os, metanolban oldott H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oldattal, 10 percig. Az aspecifikus kötőhelyeket 1 órán keresztül blokkoltuk, 5 w/v% BSA-val, PBS-ben oldva, amely 10% normál szérumot is tartalmazott. A mintákat ezután 16 órán keresztül 4°C-on inkubáltuk az elsődleges ellenanyagokkal. PBST-vel történő mosást követően a megfelelő másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk a lemezeket (lásd 2. táblázat), 1 órán át, szobahőmérsékleten. A biotinilált másodlagos ellenanyagok esetén a jelerősítést a Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) segítségével végeztük a gyártói utasítások alapján, amit 3,3-

diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) szubsztrát kromogén oldat (Dako) hozzáadásával hívtunk elő. Víztelenítés és fedés előtt hematoxin háttérfestést alkalmaztunk.

A fagyasztott metszeteken készített fluoreszcens immunfestéshez a mintákat hideg, tömény metanollal fixáltuk ( $-20^{\circ}\text{C}$ , 20 perc). Ezt követően PBST-vel mostuk őket, majd az aspecifikus kötőhelyeket 5 w/v% BSA-val blokkoltuk 1 órán keresztül, amely 10% normál szérumot is tartalmazott. Az elsődleges ellenanyaggal történő inkubálás és mosás után (amelynek lépései a paraffinos mintákon törtétekkel megegyezők voltak), a megfelelő másodlagos, fluoreszcensen jelölt ellenanyaggal inkubáltuk a metszeteket 1 órán át szobahőmérsékleten, a sejtmagok festéséhez DAPI-t használtunk. A végső mosást követően fluoreszcens fedőanyaggal (Dako) lefedtük a mintákat, a mikroszkópos képeket Nikon Eclipse E600 mikroszkóppal készítettük a Lucia Citogenetics 1.5.6 verziójú szoftver segítségével, vagy konfokális lézer scanning mikroszkóppal fotóztunk (MRC-1024, Bio-Rad). A felhasznált ellenanyagok a 2. táblázatban kerültek összefoglalásra.

### III. 5. 3. *TGF- $\beta$ 1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

A sejtvonalak tápfolyadékát a 48 órás kísérleteket követően leszívtuk a sejtekről, alacsony fordulaton lecentrifugáltuk, a felülúszót pedig fagyasztóban,  $-80^{\circ}\text{C}$ -on, tároltuk a további vizsgálatainkhoz. Ebből a felülúszóból mértünk TGF- $\beta$ 1 koncentrációt az R&D Systems „Solid Phase Sandwich ELISA kit” segítségével (Quantikine R&D Systems, Minneapolis, MN, USA, kat. szám: DB100B) a gyártói ajánlásoknak megfelelően. 50  $\mu\text{l}$  médiumot mértünk az egyes well-ekbe, és minden mintát triplikátumban vizsgáltunk.

### III. 6. Statisztikai analízis

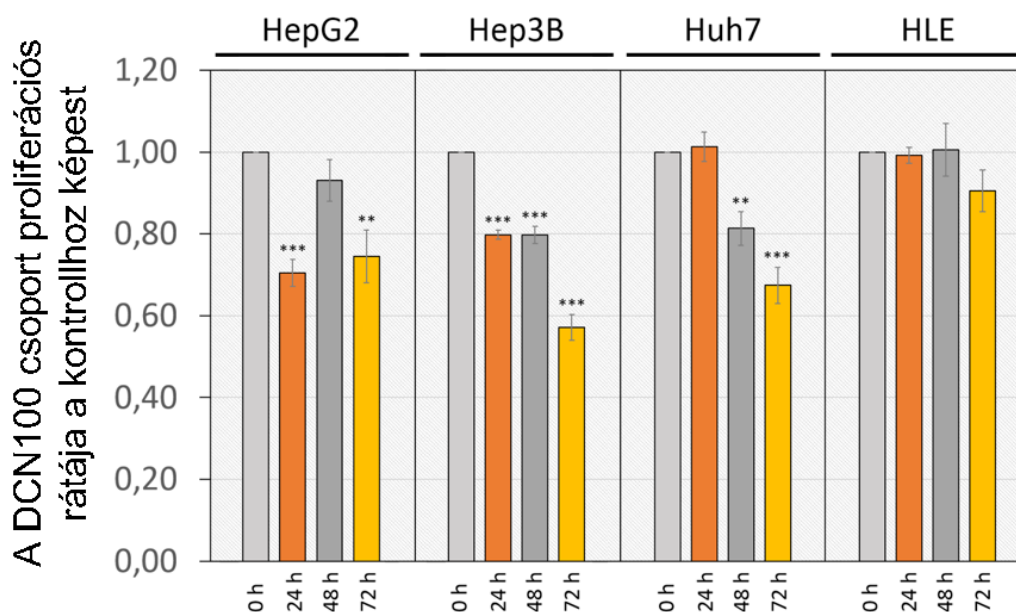
Minden statisztikai analízist a GraphPad Prism 4.03 szoftver segítségével végeztünk el. Az adatok normál eloszlását a D’Agostino & Pearson teszt segítségével vizsgáltuk. A kapott különbségek szignifikanciájának megállapítását az adatok eloszlásától függően

nem parametrikus, Mann-Whitney próbával, vagy Student-féle t-tesztel végeztük. A vad típusú, és Dcn knock-out csoportok tumor-előfordulásának különbségeit, és az eltérések szignifikanciáját  $\chi$ -négyzet próbával értékeltük. Az egymástól függetlenül elvégzett, ismételt kísérletek eredményeinek összevetésével igazoltuk a kísérletek reprodukálhatóságát. Csak az ismételhető, szignifikáns eltéréseket tartottuk valóban szignifikánsnak. A szignifikanciát a gyakorlatban is általánosan használt  $p < 0,05$  szinten állapítottuk meg.

## IV. EREDMÉNYEK

IV. 1. *In vitro* kísérletek eredményeiIV. 1. 1. *A decorin gátolja a különböző hepatóma sejtvonalak proliferációját*

A decorin proliferáció gátló hatásának vizsgálatát MTT teszttel végeztük az egyes sejtvonalakon. A 5. ábra azt mutatja, hogy a négy vizsgált sejtvonalból három esetben sikerült szignifikáns proliferáció csökkenést igazolnunk. Növekedésgátlást tapasztaltunk 24 órás kezelést követően a Hep3B sejteknél, és ez a hatás hosszútávon fennmaradt. Hasonló hatást észleltünk a HepG2 esetén is, bár 48 óránál nem egyértelmű a gátlás mértéke. A HuH7 sejtek esetén a decorin proliferáció gátló hatását csak 48 órás kezelés után figyeltük meg. A HLE sejtekben pedig mivel csak kismértékű, nem-szignifikáns csökkenést tudtunk kimutatni, a decorin gátló hatása itt csak mérsékelten érvényesült.

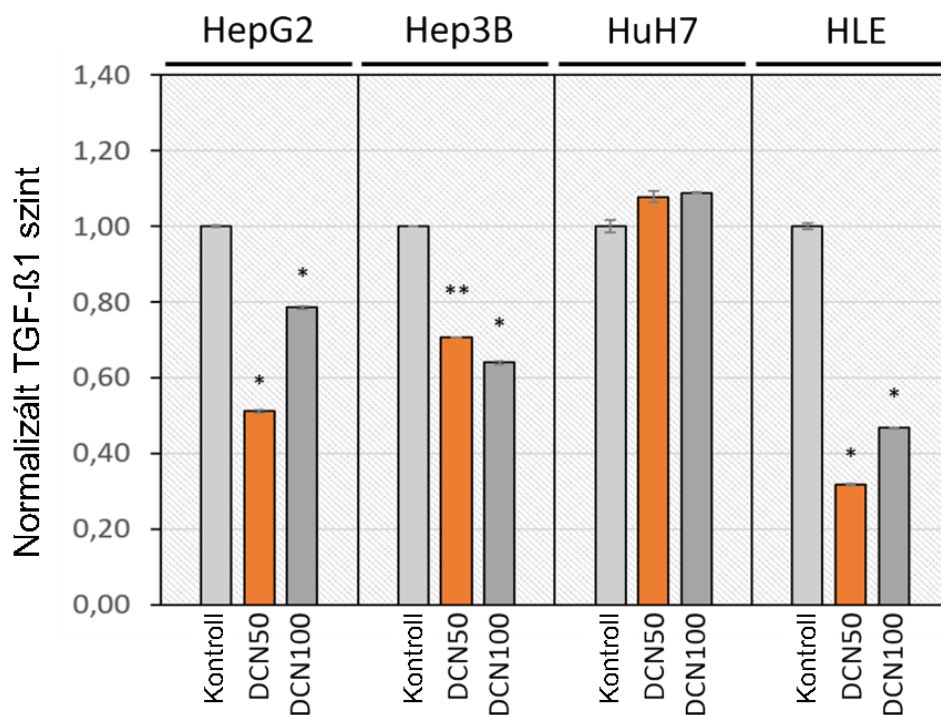


5. ábra. A vizsgált hepatóma sejtvonalak proliferációs rátája a kezeletlen kontrollhoz hasonlóan decorin kezelést követően (DCN100 = 100 µg/ml decorin). Az értékek a mérési adatok normalizált átlagai ± szórás. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### IV. 1. 2. A decorin hatása a jelátviteli útvonalakra hepatóma sejt-specifikus

##### IV. 1. 2. 1. Decorin hatása a TGF- $\beta$ 1 szekrécióra

A TGF- $\beta$ 1 szekréciót ELISA módszerrel vizsgáltuk a sejtek felülúszójából. Az 6. ábra mutatja be a mért TGF- $\beta$ 1 koncentrációt az egyes sejtvonalak médiumában a 48 órás 50 és 100  $\mu$ g/ml-es decorin kezelést követően a kezeletlen kontroll sejtekhez képest. A HepG2 sejtekben 49%-os és 21%-os, szignifikáns csökkenést mértünk a DCN50 és DCN100 decorin kezelt csoportokban (\* $p < 0,05$ ). A Hep3B és HLE sejteknél is szignifikáns változást mutattunk ki a TGF- $\beta$ 1 koncentrációjában; 29% és 36% csökkenést tapasztaltunk a DCN50 és DCN100 csoportokban a Hep3B sejtek esetén (\*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ ), míg a HLE sejteknél 68% és 53% volt a TGF- $\beta$ 1 szint visszaesés a kezelés hatására (\* $p < 0,05$ ). Ugyanakkor a HuH7 sejtek decorin kezelését követően szignifikáns változást a szekretált TGF- $\beta$ 1 koncentrációban nem tudtunk kimutatni.

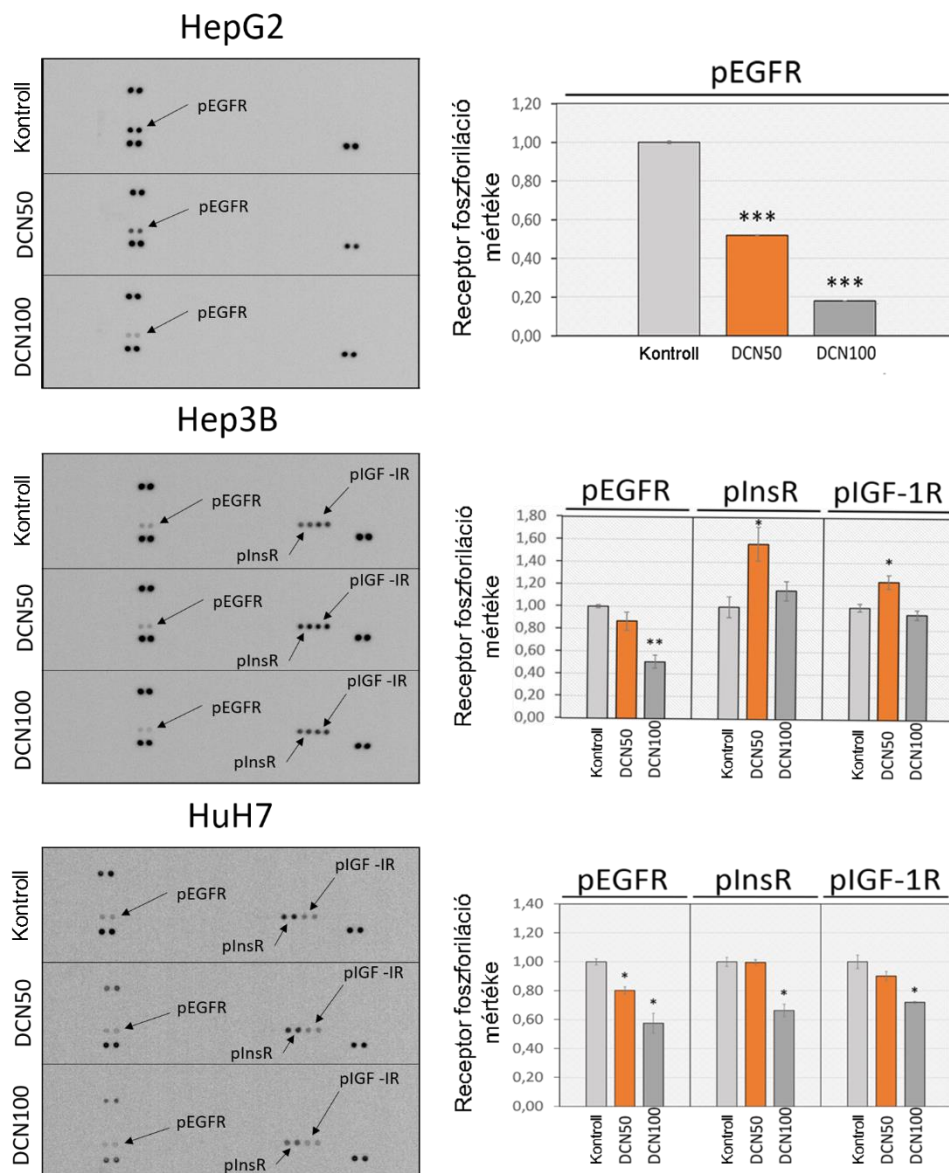


**6. ábra.** Az oszlopdiagram a normalizált, szekretált TGF- $\beta$ 1 szintet mutatja 48 órás decorin kezelést követően a vizsgált hepatóma sejtvonalak médiumaiban.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

## IV. 1. 2. 2. Decorin hatása a jelátviteli folyamatokra az egyes sejtekben

A decorin *in vitro* hatásának vizsgálatában tirozin kináz receptorok, sejtciklus szabályozó fehérjék és foszfoproteinjeik, illetve olyan jelátviteli útvonalak fő komponenseinek vizsgálatát végeztük el, amelyek közismerten szerepet játszanak a HCC progressziójában, vagy a decorinnal korábban már összefüggésbe hozták őket [35, 73-75].



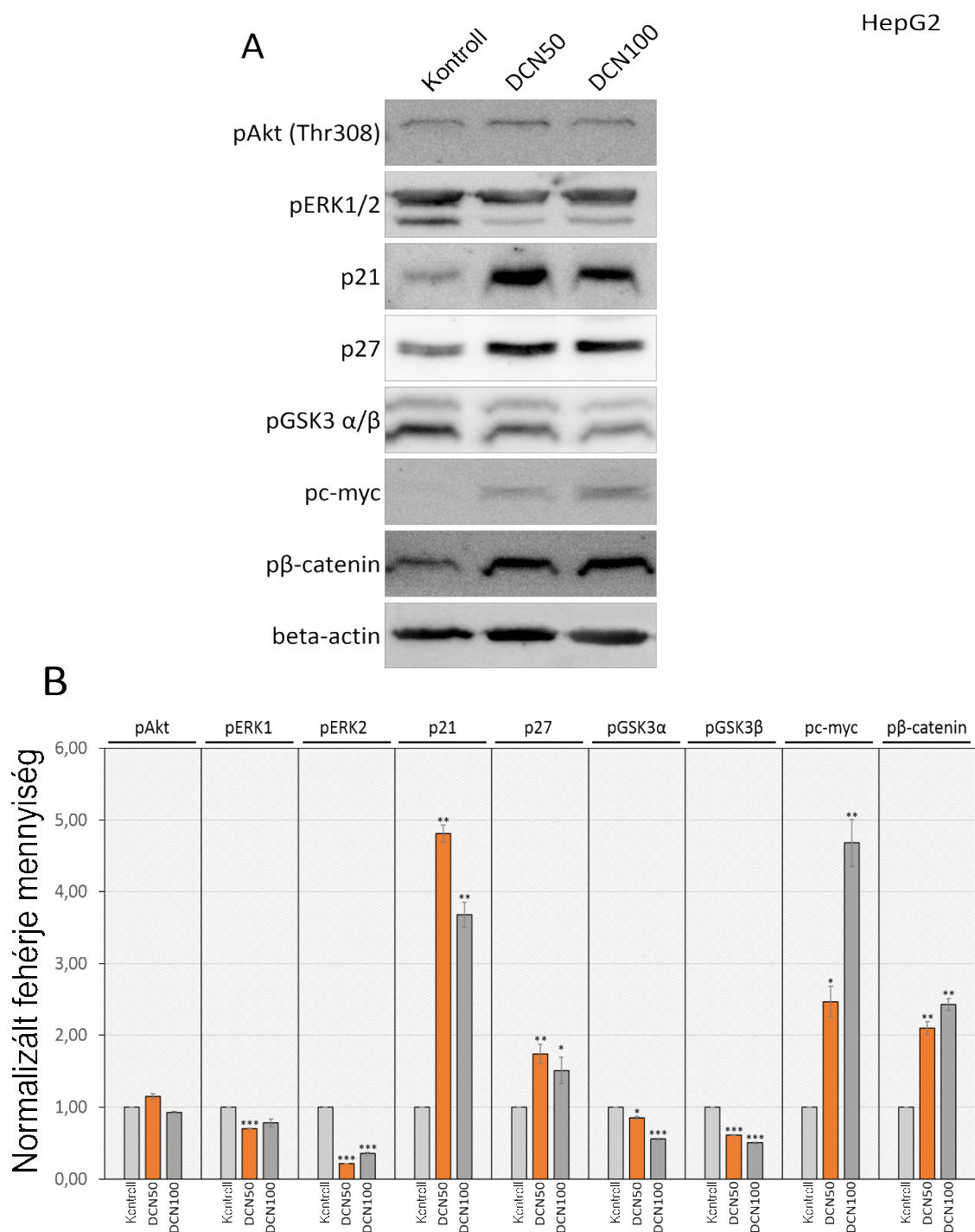
**7. ábra. Foszfo-tirozin kináz receptor array eredmények a HepG2, Hep3B és HuH7 sejt vonalakon 48 órás decorin kezelést követően. A diagramok az egyes, detektált receptorok foszforilációjának mértékét mutatják a kezelt sejtekben, normalizálva a kezeltelen kontrollhoz. \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.**



IV. 1. 2. 2. 1. *A HepG2 sejt vonal*

A HepG2 sejteken a vizsgált sejtfelszíni RTK-k közül egyedül az EGFR volt aktív (7. ábra). A foszfo-EGFR szintje jelentősen lecsökkent 48 h decorin kezelést követően, koncentrációfüggő módon (7. ábra). A pEGFR szintje 48%-kal csökkent a DCN50-es csoportban, és 84%-kal a DCN100 kezelt sejteknél a kezeletlen kontroll populációhoz viszonyítva ( $p < 0,001$ , 7. ábra).

Ugyanezen sejteken, párhuzamosan az EGFR foszforiláció csökkenésével, az ERK1, és ERK2 defoszforilációját figyeltük meg. A p-ERK1 esetén 30% ( $p < 0,001$ ) és 22%-os csökkenést regisztráltunk a DCN50 és DCN100 csoportokban, míg a p-ERK2 79% és 64%-kal csökkent a DCN50 és DCN100 kezelési csoportokban a kontroll sejtekhez képest ( $p < 0,01$  mindkét csoportban, 8. ábra). Az útvonal aktivitásának megfelelően a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> fehérje mennyisége 4,8-szorosára és 3,7-szeresére emelkedett a DCN50 és DCN100 csoportokban ( $p < 0,01$ ), míg a p27<sup>KIP1</sup> szintje 1,74-szeresére és 1,5-szörösére növekedett a DCN50 és DCN100 kezelési csoportokban a kontrollhoz képest, 48 órát követően ( $p < 0,01$  és  $p < 0,05$ , 8. ábra).

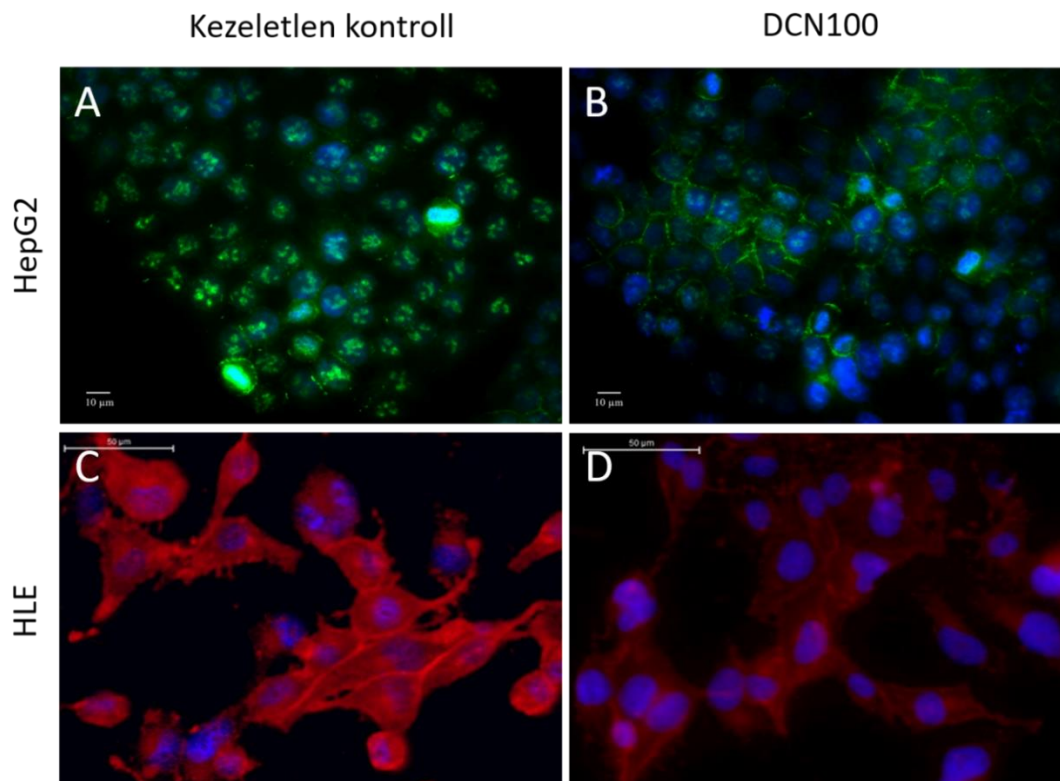


**8. ábra.** HepG2 sejtek néhány kitüntetett jelátviteli fehérjéinek Western blot analízise 48 órás decorin kezelést követően. Béta-actint használtunk betöltési kontrollnak (A). Az oszlopdiagramok a vizsgált fehérjék relatív mennyiségét mutatják be a DCN50 és DCN100 kezelési csoportokban a kezeletlen kontrollhoz képest (B). Az ábrázolt értékek az normalizált adatok átlaga  $\pm$  szórás.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

A további jelátviteli útvonalak és szereplőik közül a c-Myc, GSK3 $\alpha/\beta$  és  $\beta$ -catenin aktivitását vizsgáltuk a korábbi megfigyelések, és az irodalmi adatok alapján (8. ábra). A decorin hozzáadása a HepG2 sejtekhez csökkent GSK3 $\alpha/\beta$  foszforilációt okozott, valamint megemelkedett foszfo- $\beta$ -catenin mennyiséghez vezetett. A GSK3 $\alpha$  foszforilációja 15% és 44%-kal csökkent a DCN50 és DCN100 csoportokban a kontrollhoz képest ( $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ ), míg a foszfo-GSK3 $\beta$  mennyisége 39% és 50%-kal csökkent a kezelt csoportokban ( $p < 0,001$  mindkét esetben). Eközben a  $\beta$ -catenin foszforilációjának 2,1-szeres és 2,4-szeres emelkedését figyeltük meg a kezelt csoportokban a kontrollhoz képest ( $p < 0,01$  mindkét csoportban). Ezen felül a foszfo-c-Myc mennyisége is nőtt; 2,5-szörösére a DCN50 és 4,7-szeresére a DCN100 csoportokban ( $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ ; 8. ábra).

A fenti eredmények kiegészítéseként, a  $\beta$ -catenint eltűnni láttuk a HepG2 sejtek magjából, annak lokalizációja jellemzően a sejtmembránra korlátozódott az immuncitokémiai vizsgálatok során 48 órányi decorin kezelés hatására (9. ábra, A, B).



**9. ábra.  $\beta$ -catenin lokalizáció reprezentatív immuncitológiai képei a kezeletlen kontroll (A, C) és decorin kezelt (DCN100; B, D) HepG2 (A, B) és HLE (C, D) sejtekben. Lépték =10  $\mu$ m (A, B) and 50  $\mu$ m (C, D)**

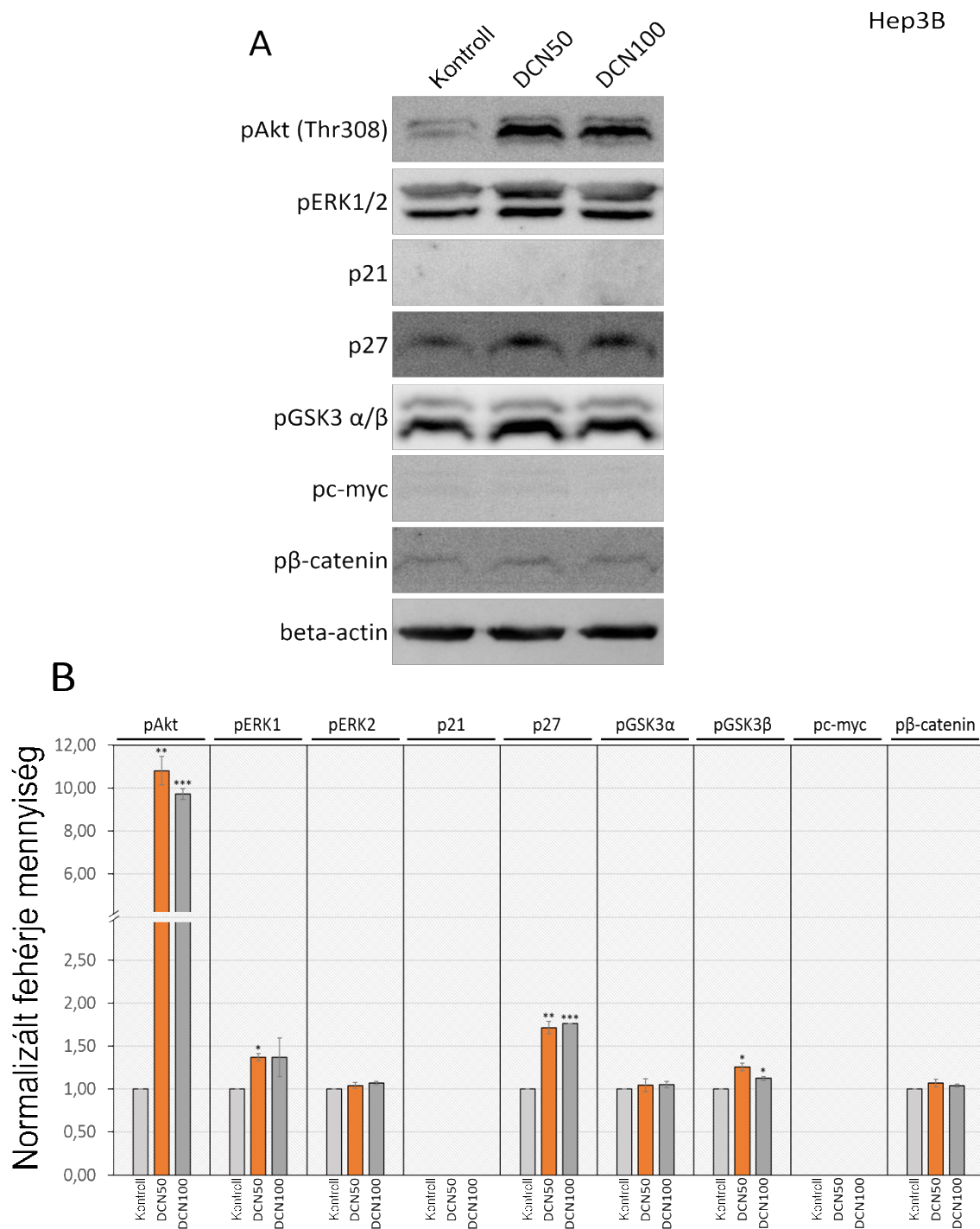
IV. 1. 2. 2. 2. *A Hep3B sejtvonal*

A Hep3B sejteken a humán rekombináns decorin kezelés hatására EGFR, InsR és IGF-IR foszforiláció-változást detektáltunk a tirozin kináz array-en (7. ábra). A HepG2-höz hasonló módon, az EGFR foszfoprotein szignifikáns csökkenését figyeltük meg (13% és 49%-os foszfo-EGFR csökkenés). Ezzel szemben az InsR és IGF-IR receptorok aktivációjában fokozódást tapasztaltunk. Amíg a pInsR 1,56-szörösára nőtt a DCN50 csoportban a kezeletlen kontrollhoz képest ( $p < 0,05$ ), a DCN100 csoportban észlelt növekedésben szignifikanciát nem tudtunk kimutatni. Az IGF-IR esetén is hasonló volt a tendencia, 23%-os növekedést láttunk a foszforilációban a DCN50 csoportban a kontrollhoz viszonyítva ( $p < 0,05$ ), ugyanakkor a DCN100 kezelési csoportban a receptor aktiváció nem emelkedett statisztikailag szignifikáns módon (7. ábra).

Az IGF és inzulin receptorok aktivációjával párhuzamosan jelentős növekedést figyeltünk meg az Akt foszforilációjában a fehérje 308-as treoninján. 10,8-szoros és 9,7-szeres foszfo-Akt növekedést tapasztaltunk a DCN50 és DCN100 csoportokban a kontroll sejtekben mértékhez képest ( $p < 0,01$  és  $p < 0,001$ ) (10. ábra).

Amíg az ERK1 foszforilációjában 37%-os növekedést detektáltunk mindkét kezelt csoportban ( $p < 0,05$  a DCN50 csoportban és nem szignifikáns a DCN100 esetében), addig szignifikáns változást az pERK2 szintjében nem figyeltünk meg.

Sem a kezeletlen kontrollból, sem a decorin kezelt Hep3B sejtekből nem tudtunk p21<sup>WAF1/CIP1</sup>-et kimutatni, ugyanakkor a p27<sup>KIP1</sup> fehérje mennyisége szignifikáns emelkedést mutatott 48 óra decorin kezelést követően: 71%-os és 76%-os emelkedést tapasztaltunk a DCN50 és DCN100 csoportokban ( $p < 0,01$  és  $p < 0,001$ ) (10. ábra).

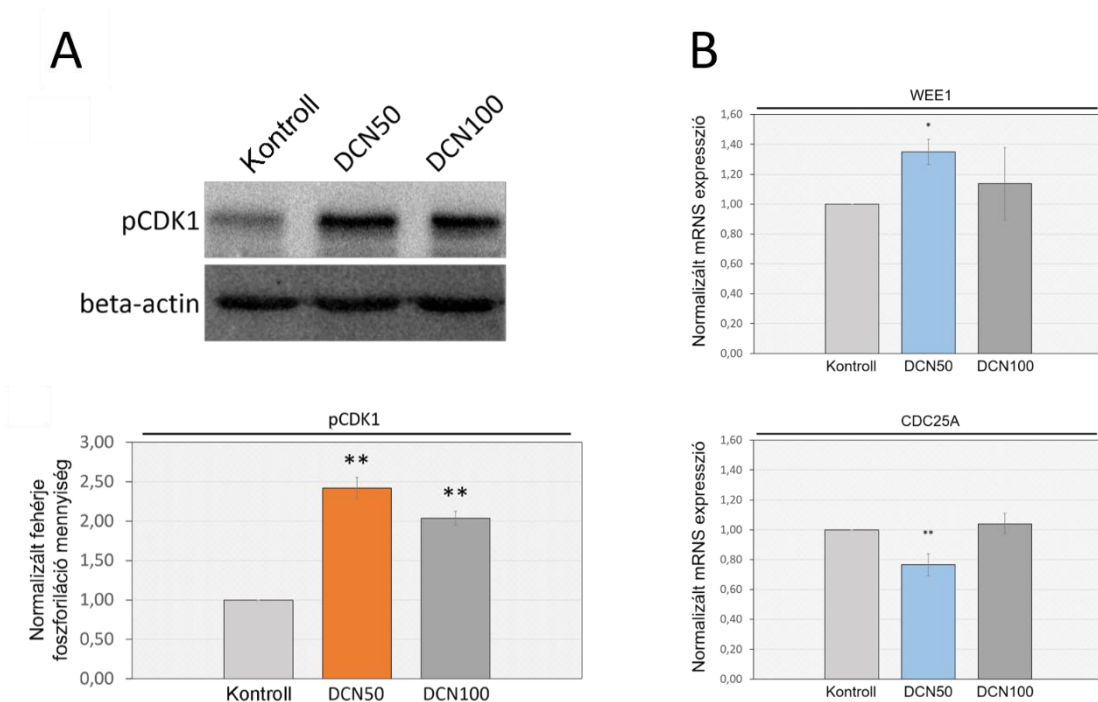


**10. ábra. Hep3B sejtek kitüntetett jelátviteli fehérjéinek Western blot analízise 48 órás decorin kezelést követően. Béta-actint használtunk betöltési kontrollnak (A). Az oszlopdiagramok a vizsgált fehérjék relatív mennyiségét mutatják be a DCN50 és DCN100 kezelési csoportokban a kezeletlen kontrollhoz képest (B). Az ábrázolt értékek az normalizált adatok átlaga  $\pm$  szórás.**

**\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.**

A GSK3 $\alpha$  foszforilációja nem változott decorin kezelés hatására a kontroll sejtekhez képest, azonban a foszfo-GSK3 $\beta$  mennyiségében kis mértékű 26%-os és 12%-os emelkedést mutattunk ki a DCN50 és DCN100 csoportokban ( $p < 0,05$  mindkét esetben). Szignifikáns változást sem a foszfo-c-Myc, sem a foszfo- $\beta$ -catenin mennyiségében nem tapasztaltunk a decorin kezelést követően a Hep3B sejtekben (10. ábra).

Mivel a Hep3B sejtek TP53 és RB mutánsok, emiatt a sejtek bizonyosan keresztüljutnak a G1 fázis restrikciós pontján. Ezért olyan sejtciklus regulátort kerestünk, amely a G1 fázis után következik. Western blot segítségével kimutattuk, hogy a decorin kezelés indukálja a CDK1 foszforilációját; 2,42-szoros emelkedést tapasztaltunk a foszfo-CDK1 mennyiségében a DCN50 csoportban, míg 2,04-szoros növekedést a DCN100 kezelt csoportban ( $p < 0,01$  mindkét csoportban, 11. ábra, A). Ezzel párhuzamosan a WEE1 35%-os mRNS expressziós növekedését mértük a DCN50 kezelési csoportban ( $p < 0,05$ ), és a CDC25A 23%-os csökkenését tapasztaltuk szintén a 50  $\mu\text{g/ml}$ -es decorin koncentrációval kezelt Hep3B sejteknél ( $p < 0,01$ , 11. ábra, B). A DCN100 csoportban a változás egyik esetben sem volt szignifikáns (11. ábra, B).



**11. ábra. Hep3B sejtek foszfo-CDK1 Western blot (A), valamint WEE1 és CDC25A Real-time PCR analízise 48 órás decorin kezelést követően (B). A diagramok a denzitometriás méréséből származó normalizált értékeit (A), és a megjelölt gének normalizált mRNS expresszióját mutatják (B). Béta-actint használtunk betöltési kontrollnak. Az ábrázolt értékek az normalizált adatok átlaga  $\pm$  szórás. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$**

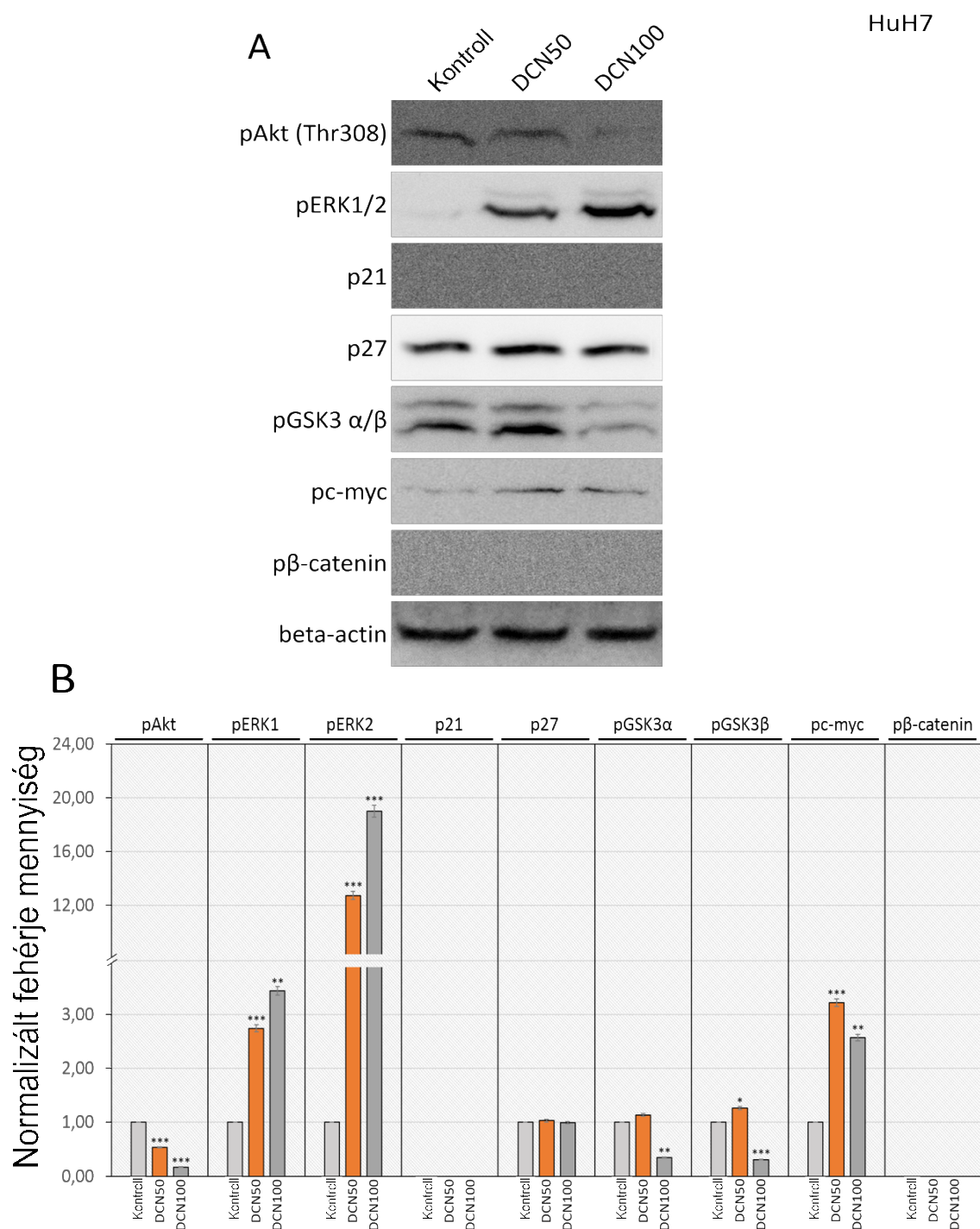
#### IV. 1. 2. 2. 3. A HuH7 sejt vonal

A HuH7 sejteken, a Hep3B-hez hasonlóan, aktivált EGFR, InsR és IGF-IR receptorok találhatóak. Az EGFR foszforilációja decorin kezelést követően dózisfüggő módon, szignifikánsan csökkent 20%-kal, illetve 42%-kal. Az InsR és IGF-IR receptorok foszforilációja szintén megváltozott a kezelést követően, azonban szignifikáns eltérést csak a DCN100 csoportban tudtunk kimutatni; a foszforiláció mértéke 34%-kal csökkent az InsR, és 28%-kal az IGF-IR esetében ( $p < 0,05$  mindkét esetben) (7. ábra).

Előbbieknek megfelelően, a foszforilált Akt mennyisége is lecsökkent a decorin kezelt sejtekben; a DCN50 csoportban 44%-kal, a DCN100 csoportban pedig 82%-kal

kevesebb foszfo-Akt-ot tudtunk kimutatni, mint a kezeletlen kontroll sejtekben ( $p < 0,001$  mindkét esetben). Mindezzel szemben jelentős ERK aktivációt detektáltunk a kezelést követően a HuH7 sejtekben. 2,80-szoros és 3,93-szoros növekedést figyeltünk meg az foszfo-ERK1 mennyiségében a DCN50 és DCN100 csoportokban ( $p < 0,001$  és  $p < 0,01$ ), míg 12,74-szoros és 19,83-szoros volt a pERK2 emelkedés a kezelt csoportokban a kontrollhoz képest ( $p < 0,001$  mindkét esetben). A p21<sup>WAF1/CIP1</sup> CDK inhibitort sem a kontroll, sem a kezelt HuH7 sejtekből nem tudtuk kimutatni, és a p27<sup>KIP1</sup> esetében is csak kis mértékű, nem szignifikáns változást figyeltünk csak meg (12. ábra).





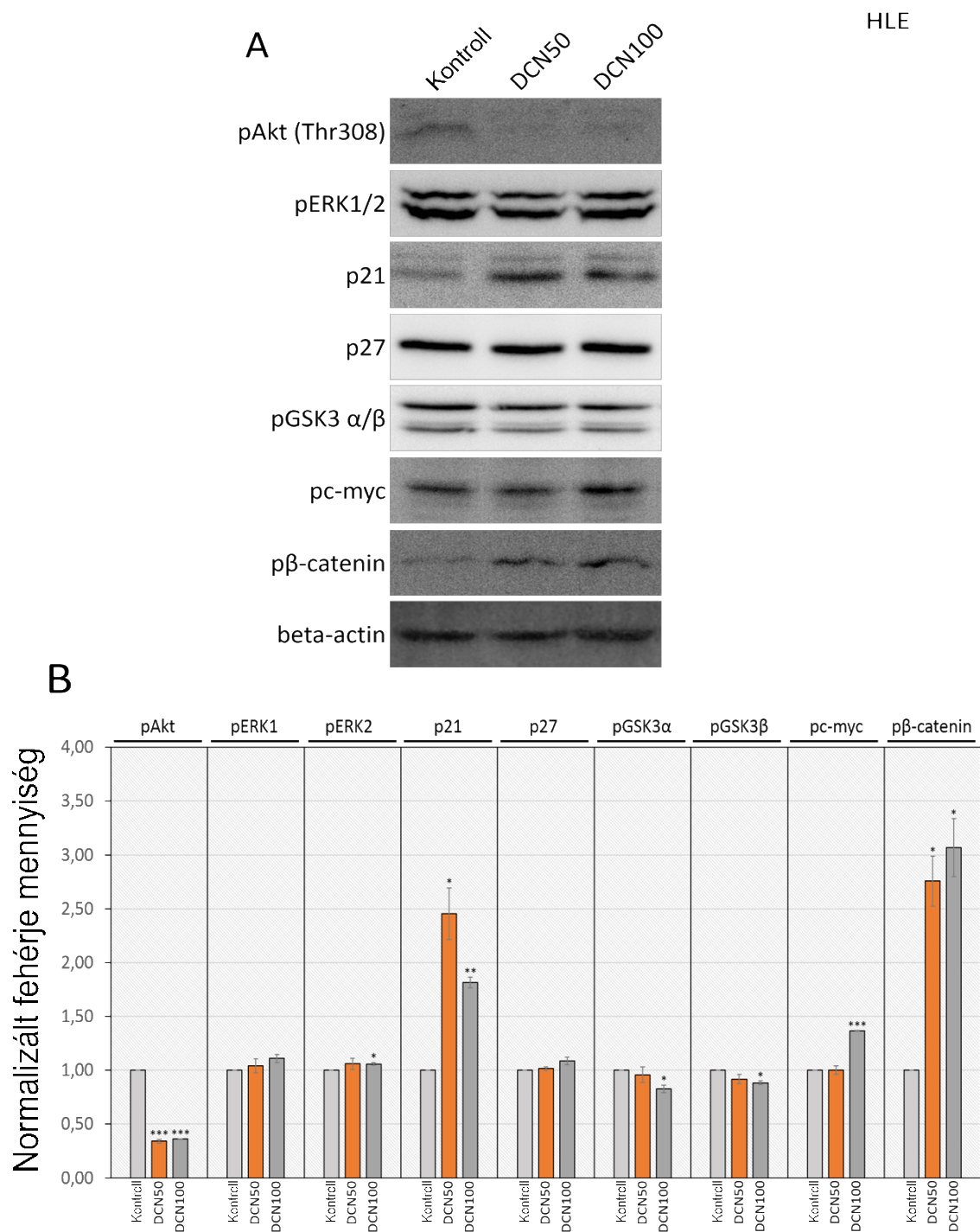
**12. ábra. HuH7 sejtek kitüntetett jelátviteli fehérjéinek Western blot analízise 48 órás decorin kezelést követően. Béta-actint használtunk betöltési kontrollnak (A). Az oszlopdiagramok a vizsgált fehérjék relatív mennyiségét mutatják be a DCN50 és DCN100 kezelési csoportokban a kezeletlen kontrollhoz képest (B). Az ábrázolt értékek az normalizált adatok átlaga ± szórás.**

**\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001.**

A GSK3 foszforiláció azonban nagyon hasonló mintázatot mutatott, mint az InsR és IGF-IR receptorok foszforilációja. A foszfo-GSK3 $\alpha$  mennyisége a DCN50 csoportban szignifikánsan nem változott, míg a DCN100 csoportban 61%-kal lecsökkent ( $p < 0,05$ ). Ezzel párhuzamosan, a GSK3 $\beta$  foszforiláció a DCN50 csoportban habár megemelkedett 32%-kal ( $p < 0,05$ ), a DCN100 kezelési csoportban foszfo-GSK3 $\alpha$ -hoz hasonlóan látványosan, 62%-kal lecsökkent ( $p < 0,001$ ). Az fentiek mellett jelentős c-Myc foszforilációt detektáltunk a 48 órás decorin kezelés hatására. 3,17-szoros emelkedést figyeltünk meg a DCN50 csoportban ( $p < 0,001$ ) és 2,92-szoros növekedést a DCN100 csoportban a kezeletlen kontrollhoz képest ( $p < 0,01$ ). Foszforilált  $\beta$ -catenint a HuH7 sejtekből nem sikerült kimutatnunk (12. ábra).

#### IV.1.2.2.4. *A HLE sejtvonal*

A HLE sejteken nem tudtunk aktív, foszforilált tirozin kináz receptort kimutatni. Ezen megfigyelés ellenére jelentős változást tapasztaltunk az Akt foszforilációjában; 66%-os és 64%-os csökkenést a DCN50 és DCN100 csoportokban a kontroll sejtekhez viszonyítva ( $p < 0,001$  mindkét csoportban). Ugyanakkor érdemi változást az ERK1/2 foszforilációjában nem figyeltünk meg. Amíg a p27<sup>KIP1</sup> nem változott a decorin jelenlétében, a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mennyisége szignifikáns módon megemelkedett (2,45-szoros növekedés a DCN50 és 1,82-szoros emelkedés a DCN csoportokban ( $p < 0,05$  és  $p < 0,01$ ) (13. ábra).



**13. ábra.** HLE sejtek kitüntetett jelátviteli fehérjéinek Western blot analízise 48 órás decorin kezelést követően. Béta-actint használtunk betöltési kontrollnak (A). Az oszlopdiagramok a vizsgált fehérjék relatív mennyiségét mutatják be a DCN50 és DCN100 kezelési csoportokban a kezeletlen kontrollhoz képest (B). Az ábrázolt értékek az normalizált adatok átlaga  $\pm$  szórás.

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

A GSK3 fehérjék foszforilációjában enyhe csökkenést tapasztaltunk; a GSK3 $\alpha$  foszforilációja 4% és 17%-kal csökkent a kezelt csoportokban ( $p < 0,05$  a DCN100 csoportban), a foszfo-GSK3 $\beta$  pedig 8% és 12%-kal lett kevesebb a DCN50 és DCN100 csoportokban a kontroll populációhoz képest a kezelés hatására ( $p < 0,05$  a DCN100 csoportban). Amíg a c-Myc foszforilációjában nem tudtunk változást kimutatni a DCN50 csoportban, a magasabb kezelési koncentráció hatására 37%-os növekedést figyeltünk meg ( $p < 0,001$ ). Végezetül, jelentős  $\beta$ -catenin foszforilációt detektáltunk a HLE sejtekben a decorin kezelés hatására; 2,76-szoros növekedést a DCN50 csoportban, és 3,07-szoros növekedés a DCN100 csoportban a kezeletlen kontrollhoz képest ( $p < 0,005$  mindkét esetben) (13. ábra). A  $\beta$ -catenin mennyiségi csökkenését immunhisztokémia segítségével is sikerült alátámasztanunk (9. ábra C, D).

A 3. táblázatban összefoglaltuk a hepatóma sejtekben tapasztalt, decorin okozta jelátviteli változásokat.

3. táblázat: Decorin kezelés indukálta molukuláris változások az egyes hepatóma sejtvonalakban

	HepG2	Hep3B	HuH7	HLE
<b>Növekedési faktorok</b>				
TGF- $\beta$ 1	↓	↓	∅	↓
<b>Receptorok</b>				
EGFR	↓	↓	↓	–
InsR	–	↑	↓	–
IGF-1R	–	↑	↓	–
<b>Jelátviteli mediátorok</b>				
Akt	∅	↑	↓	↓
GSK3 $\beta$	↑	↓	↑	↑
$\beta$ -catenin	↓	∅	–	↓
c-myc	↓	–	↓	↓
ERK 1/2	↓	↑	↑	∅
<b>Effektorok, sejtciklus szabályozás</b>				
p21	↑	–	–	↑
p27	↑	↑	∅	∅
CDK1	–	↓	–	–
WEE1	–	↑	–	–
CDC25A	–	↓	–	–

Jelmagyarázat:

■: sejt növekedését támogató változás

■: sejt növekedését gátló változás

↑: expressziós/mennyiségi/aktivációs növekedés

↓: expressziós/mennyiségi/aktivációs csökkenés

∅: nem mértünk változást

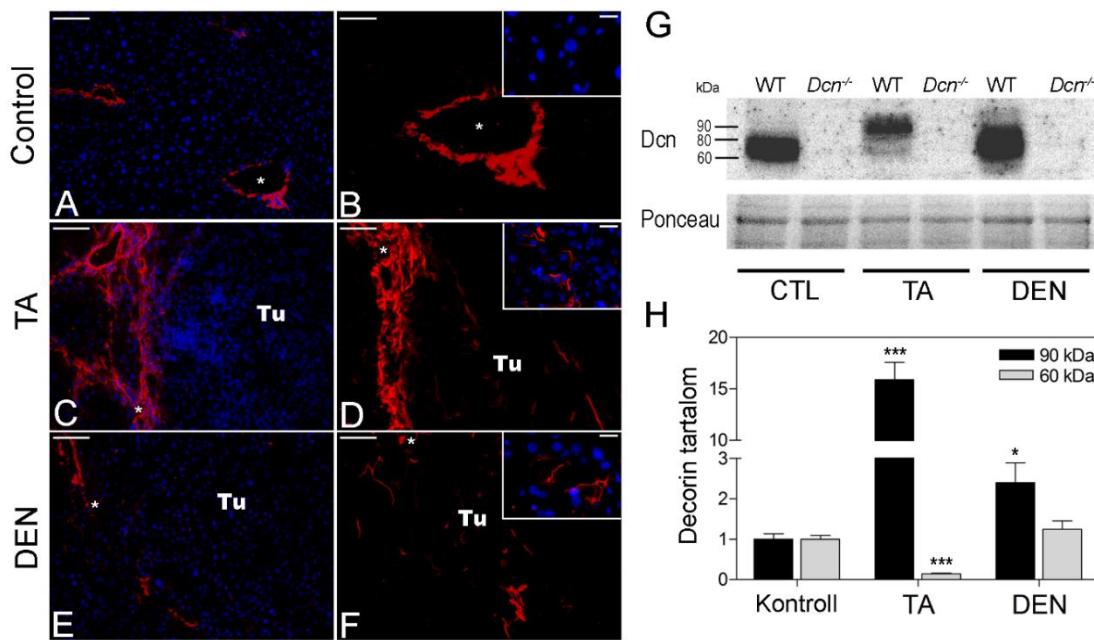
– : nem detektáltuk

- : nem vizsgáltuk

## IV. 2. Állatkísérletek eredményei

### *IV. 2. 1. A decorin kvalitatív és kvantitatív változásai a TA és DEN indukált tumorokban*

Fiziológiás körülmények közt a decorin elsődlegesen a peri-portalis területeken található meg a májban, főleg a centrális véna körül (14. ábra A, B). Vizsgálatainkban a TA cirrhosis-t indukáló hatásának következtében, és az emiatt kialakuló fokozott kötőszövet-termelés miatt, a decorin mennyisége megemelkedett a kezelt, vad típusú állatokban, amelyet immunfestéssel mutattunk ki. A decorin mennyiségi növekedése a fibrotikus septum-okban, valamint focalis felhalmozódás a tumorstromában egyaránt megfigyelhető volt. Az immunfestődés a TA- és DEN-indukált tumorok esetén összességében igen hasonlóknak bizonyult (14. ábra C-F). A tumoros góc körül jól detektálható decorin pozitív területek voltak megfigyelhetőek. Érdekes módon nemcsak mennyiségi, hanem minőségi változást is sikerült kimutatnunk a decorin glycanatio-jában. Amíg a vad típusú kontroll mintákból származó decorin 60 és 80 kDa között, 'smear' formában jelent meg Western bloton, addig a TA-kezelt májából származó minták esetén egy diszkrétebb, 90 kDa körüli jelet detektáltunk (14. ábra G, H).



**14. ábra. Decorin mennyiségének és lokalizációjának változása a májdaganatban. Decorin immunfestés (pirossal) a kontroll májban (A, B), a tioacetamid kezelt májban (C, D), és a dietil-nitrózamin kezelt májban (E, F). A jobb felső sarokban lévő képek a tumor belsejéből készített nagyítások. A sejtmagokat DAPI-val festettük. Tu = tumor. A csillagok a metszet ugyanazon részeit jelölik a különböző nagyításokban. Lépték = 100  $\mu$ m az A, C-ben és E-ben, 50  $\mu$ m a B, D-ben és F-ben, 15  $\mu$ m jobb felső sarokban lévő képeken. Reprezentatív kép a decorin Western blot membránról. Ponceau-festést használtunk betöltési kontrollként (G). A diagram a két különböző méretű decorin denzitometriával meghatározott relatív mennyiségét mutatja be a kezelt állatokban a kontrollhoz képest (H). Az ábrázolt értékek az normalizált adatok átlaga  $\pm$  szórás.**

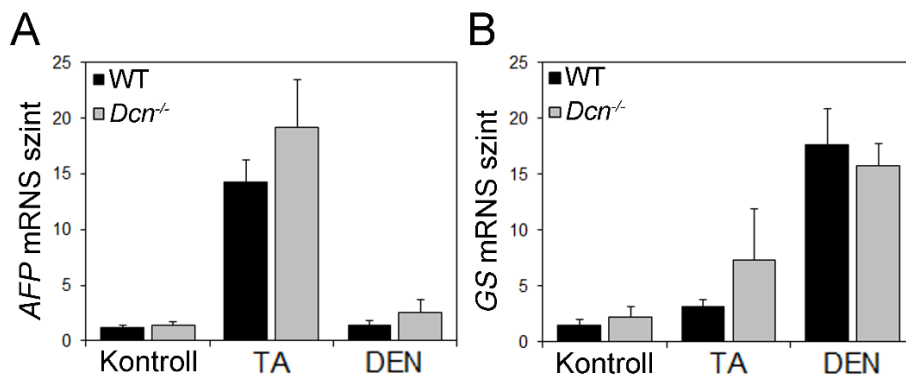
**\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001.**

A DEN kezelés során is észleltünk eltérést a molekulasúlyban, de jóval kisebb mértékben, mint a TA-kezelés esetén. Megjegyezendő, hogy a magas molekulásúlyú decorin mennyiségének szignifikáns növekedését figyeltük meg mindkét kezelést követően. Ezek alapján feltételezhető, hogy a decorin expresszió dinamikusán változik a hepatokarcinogenezis során, különösen a TA kezelést követő tumorprogresszióban, ahol a stróma szerepe eleve kifejezettebb a cirrhosis miatt, mint a DEN-indukálta tumorok esetén.



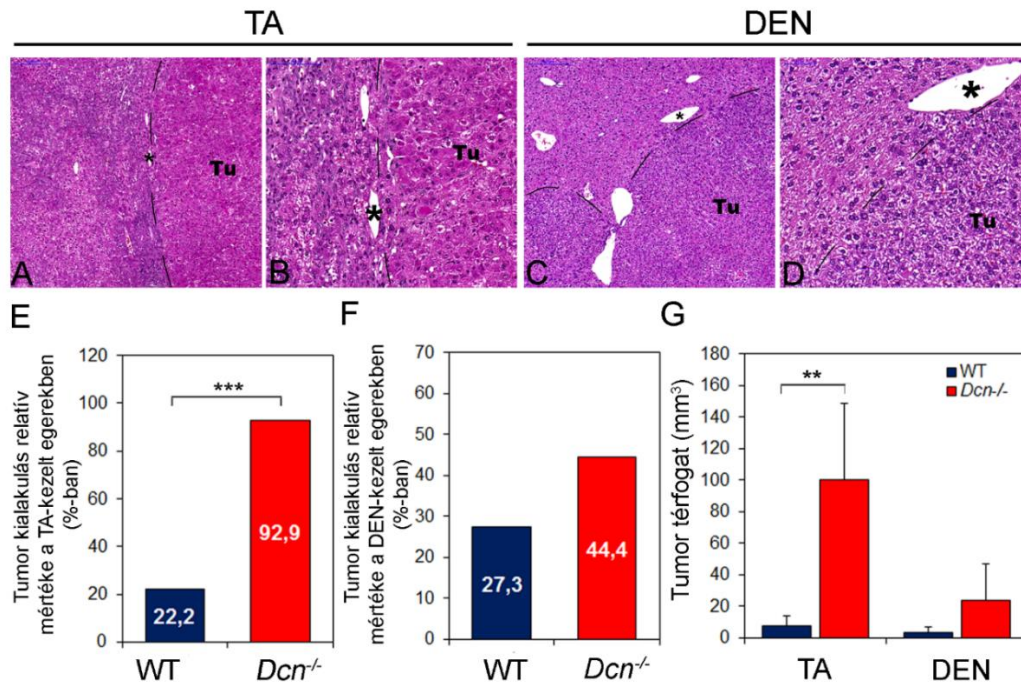
#### IV. 2. 2. A decorin hiánya hajlamosít az indukált májrák kialakulására

Az eltérő hepatokarcinogenezis modellek a vártak megfelelően más fenotípusú tumorokat eredményeztek. Alfa-foetoprotein (AFP), és glutamin szintetáz (GS) mRNS expresszió meghatározásával igazoltuk ezeket a különbségeket. A TA-indukált tumorokban jellemzően az AFP expressziója emelkedett, viszont a DEN kezelés hatására a GS mRNS szintjében mértünk jelentősebb növekedést (15. ábra). A tioacetamid (TA) metabolizmusa a hepatocitákban a citokróm p450-en keresztül valósul meg, amely először fibrosishoz, majd cirrhosishoz vezet. Ennek megfelelően, a TA kezelés fokozott hepatocita regenerációt okozott, ami a hepatokarcinogenezis iniciátora a cirrhotikus májban. A TA-indukált tumorsejtben a citoplazma mennyiségének emelkedése volt megfigyelhető, erős eosinophil festődéssel, a tumorokat kötőszövetes tok vette körül (16. ábra A, B). Ezzel szemben a nagy dózisú dietil-nitrózamin (DEN) adása közvetlen DNS károsodást okozott, a fibrotikus változások nélkül. Ezeknek a tumorsejteknek kis mennyiségű, basophil festődésű citoplazmájuk volt, amelyek gyakran törtek be az erekbe (16. ábra C, D).



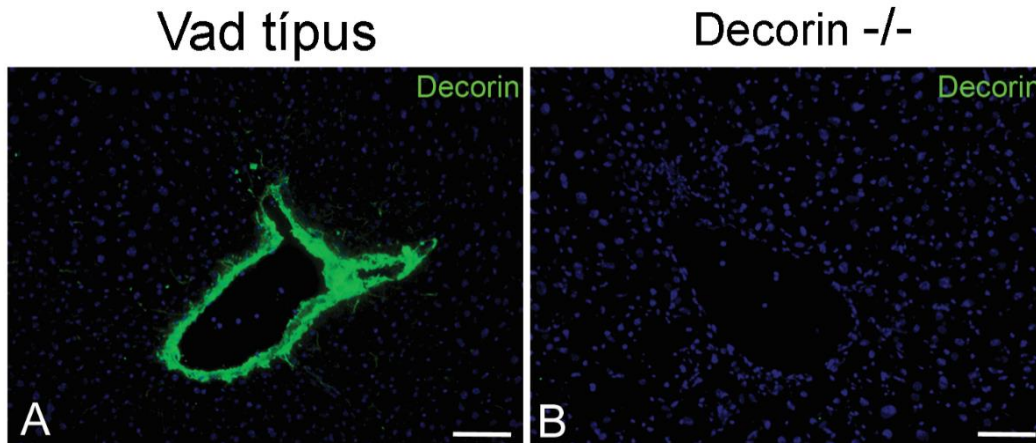
**15. ábra. Változások az alfa-foetoprotein (AFP) (A) és a glutamin szintetáz (GS) (B) mRNS expressziós szintekben vad típusú (WT) és decorin hiányos *Dcn*<sup>-/-</sup> egerek tumoros májaiban. Az ábrázolt értékek az normalizált adatok átlaga ± szórás.**





**16. ábra.** Tioacetamid (A, B) és dietil-nitrózamin (C, D) indukált tumoros májak reprezentatív, hisztológiai képei. Tu = tumor, a szaggatott vonal a tumor határát jelöli. A csillagok a metszet ugyanazon részeit jelölik a különböző nagyításokban. Lépték = 200  $\mu$ m az A-ban és C-ben, 100  $\mu$ m a B és D esetén. Az oszlopdiagramok a tumoros egerek arányát mutatják be a kísérleti csoportokban a vad típusú (WT) és decorin knock-out (*Dcn*<sup>-/-</sup>) egerekben TA kezelést (E) és DEN kezelést (F) követően. N=15 a TA kezelt csoportnál és N=10 a DEN kezelt csoport esetén. \*\*\* $p < 0,001$  ( $\chi^2$ -próba). Az G ábrán az oszlopok a TA és DEN kezelt májak tumortérfogatait mutatják be mm<sup>3</sup>-ben. \*\* $p < 0,01$ . Az ábrázolt értékek az adatok átlaga  $\pm$  szórás.

Immunfestéssel csak a vad típusú egerek májában volt kimutatható a decorin, amely állatokban a periportális kötőszövetben és a centrális véna körül volt fellelhető. Ahogy az várható volt, a decorin knock-out állatokban nem kaptunk jelet (17. ábra). A decorin hiányos egerek 93%-ában fejlődött makroszkóposan is megfigyelhető májdaganat TA-kezelés hatására, amíg a vad típusú állatoknál ez csak 22% volt (n=15,  $p < 0,001$ , 16. ábra E).



**17. ábra. Reprezentatív decorin immunhisztokémiai kép vad típusú egér májmetszetén (A), és decorin hiányos (B) egér mintáján. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. Lépték = 100  $\mu$ m.**

A TA kezelt egerekhez hasonlóan, a DEN kezelés a  $Dcn^{-/-}$  állatok 44%-ban vezetett daganat kialakuláshoz szemben a vad-típusú állatoknál megfigyelt 27%-kal, bár ez az eredmény nem érte el a statisztikai szignifikancia határát ( $n = 10$ ,  $p = 0,12$ , 16. ábra F).

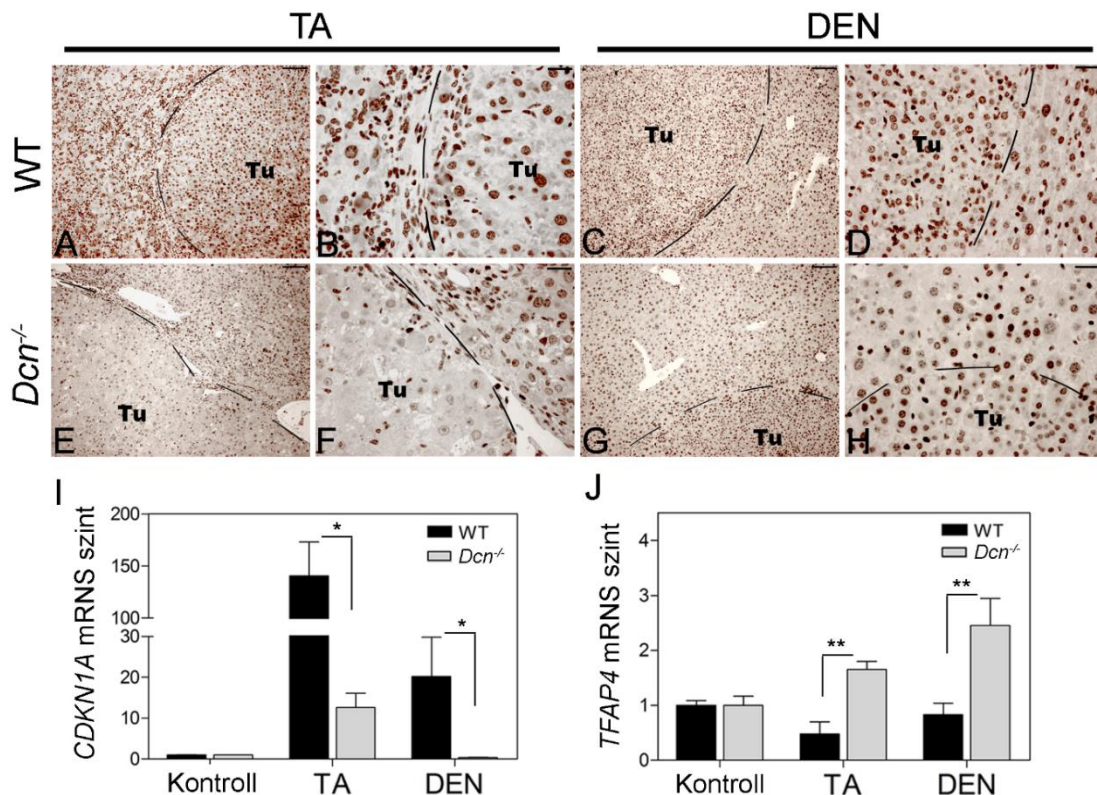
Ezzel párhuzamosan, a TA és a DEN kezelés is szignifikánsan növelte a tumortérfogatot a decorin hiányos állatokban a vad típushoz képest. A TA kezelés során ezek az értékek  $100,4 \text{ mm}^3$  vs.  $7,6 \text{ mm}^3$  a  $Dcn^{-/-}$  és kontroll csoportokban ( $p < 0,01$ ), a DEN-os kísérletben  $23,7 \text{ mm}^3$  vs.  $3,4 \text{ mm}^3$  értékeket kaptunk (16. ábra G).

Megállapítható, hogy a decorin hiánya érzékenyíti a májat a tumorképződésre, és hogy a TA kísérletben, amelynek során cirrhotikus talajon fejlődik a daganat, a decorin hatása hangsúlyosabb különbségeket mutatott a hepatokarcinogenezisben a kontrollhoz képest, mint a DEN indukált tumorok esetében.

#### IV. 2. 3. *A decorin hiánya felgyorsítja a sejtciklust*

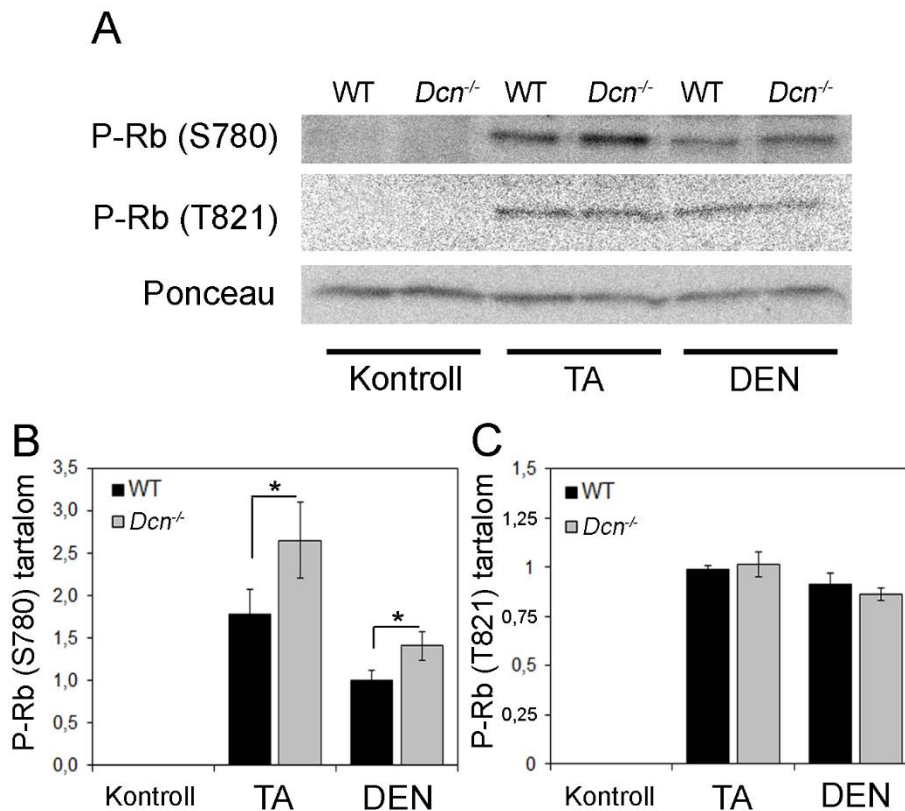
Mivel a decorin a legtöbb esetben közismerten a  $p21^{\text{WAF1/CIP1}}$ -en keresztül fejt ki tumorszuppresszor hatását, ellenőriztük, hogy vajon a saját kísérleti rendszerünkben is hasonlóan tapasztaljuk-e. A kontroll, kezeletlen állatokban a  $p21$  alacsony szintjét mutattuk ki immunhisztokémia segítségével mind a vad típusú, mind a decorin hiányos

egerek májában (20. ábra A-D). TA kezelés hatására jelentős növekedés volt megfigyelhető a p21 mennyiségében vad-típusú állatok mintáiban. A hepatociták, kötőszöveti sejtek, valamint a tumorsejtek is intenzív immunfestődést mutattak (18. ábra A, B). Ezzel szemben a decorin hiányos egerekben a p21 felhalmozódása nem volt megfigyelhető (18. ábra E, F). A DEN kezelés is megemelte a p21 szintjét a sejtekben, de a decorin hiánya jóval kevésbé befolyásolta a folyamatot, mivel számottevő p21 immunpozitivitás volt megfigyelhető a *Dcn*<sup>-/-</sup> mintákban lévő tumorsejtek sejtmagjaiban (18. ábra C, D, G, H).



**18. ábra.** Változások a p21<sup>WAF/CIP1</sup> szintjében vad típusú és decorin knock-out (*Dcn*<sup>-/-</sup>) egerekben hepatokarcinogenezis során. p21<sup>WAF/CIP1</sup> immunhisztokémiai analízis májtumor metszeteken TA és DEN kezelést követően vad típusú állatokban (A-D) és *Dcn*<sup>-/-</sup> egerekben (E-H). Tu = tumor. A szaggatott vonalak a tumorhatárokat jelölik. Lépték = 100  $\mu$ m a A, C, E, G -ben, és 25  $\mu$ m a B, D, F, H-ban. Az oszlopdigrammok a CDKN1A (I) és TFAP4 (J) mRNS szintjeinek változását mutatják be a vad típusú és *Dcn*<sup>-/-</sup> egerekben TA és DEN kezelést követően a kezeletlen kontrollhoz képest. Az ábrázolt értékek az adatok átlaga  $\pm$  szórás. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Ezután qPCR segítségével vizsgáltuk a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (CDKN1A) és az AP4 transzkripciós faktor (TFAP4) expresszióját (AP4 egy c-MYC-indukált basic helix–loop–helix leucin-zipzár transzkripciós faktor, amely gátolja a CDKN1A génkifejeződését). A tioacetamid kezelés 140-szeresére, míg a DEN kezelés 20-szorosára emelte a CDKN1A mRNS expressziót, a kezeletlen, kontroll mintákhoz képest (18. ábra I). Megjegyezendő, hogy a decorin hiányos állatok mintáiban eleve szignifikánsan alacsonyabb volt a CDKN1A alap-expressziója, függetlenül attól, hogy kezeltük-e az egereket karcinogénnel-e, vagy sem ( $p < 0,05$ ). Ennek megfelelően szignifikáns növekedést tapasztaltunk a TFAP4 génexpresszióban a decorin hiányos mintákban a vad típusú mintákhoz képest ( $p < 0,01$ , 18. ábra J). A TA és a DEN kezelések az AP4 szintjét 52%-kal és 17% csökkentették. Ennek megfelelően, a decorin hiánya CDKN1A expresszió gátláshoz vezet, különösen TA kezelés hatására, TFAP4 indukciója mellett. Annak meghatározására, hogy a p21 pontosan mely ponton lép be a sejtciklus szabályozásába a kísérletes modellünkben, a retinoblasztóma (Rb) fehérje különböző foszforilációs helyeinek állapotát vizsgáltuk foszfo-specifikus ellenanyagok segítségével (Ser780 és Thr821), Western bloton (19. ábra A). A TA-indukált májtumorokban kifejezett Rb foszforiláció volt megfigyelhető a Ser780 pozícióban, amely a CDK4-n keresztül szabályozódik, és amely jóval kifejezettebb volt a Dcn<sup>-/-</sup> mintákban, mint a vad típusúakban (1,77-szoros, és 2,65-szoros növekedés, 19. ábra B). A DEN kezelés 40%-kal magasabb Rb-foszforilációt eredményezett a Ser780 foszforilációs helyen a decorin hiányos állatokban, mint a vad típusú társaikban (19. ábra B).



**19. ábra. A Ser780 és Thr821 pozíciókban foszforilált retinoblasztóma (Rb) fehérje Western blot analízise a vizsgált egérmájak lizátumaiban. Ponceau-festést használtunk betöltési kontrollnak (A). Az diagramok oszlopai a foszfo-Rb Ser780 (B) és Thr821 (C) foszforilációs helyeinek foszforiláltságának relatív mértékét mutatják be a vad típusú, és decorin hiányos (*Dcn*<sup>-/-</sup>) TA, és DEN kezelt egerekben a kezeletlen kontrollhoz képest. Az ábrázolt értékek az adatok átlaga ± szórás. \* $p < 0,05$ .**

Thr821 hely foszforilációjáért a CDK2 felel. A TA és DEN kezelések ugyan minden esetben növelték a Thr821 foszforilációját a retinoblasztomán, különbséget a vad típusú és a decorin hiányos egerek között nem tudtunk kimutatni (19. ábra C).

A decorin hiánya tehát AP4 aktivációval, p21 represszióval, ennek következtében pedig CDK4/ciklinD komplexen keresztül Rb foszforilációhoz vezet a Ser780-on. Ezen az mechanizmuson keresztül képesen a sejtek túljutni a G1 fázis restrikciós pontján, amely végső soron kedvez a tumor növekedésének.



#### *IV. 2. 4. A fő szignalizációs útvonalak a HCC-ben, melyek a decorin hiányos állapotban működnek*

A következőkben, hasonlóan a sejtvonalakon végzett munkához, azonosítani igyekeztünk azokat a decorin hiányában aktiválódó fő útvonalakat, amelyek a HCC tumoros progressziójáért felelőssé tehetők. Számos olyan molekulát vizsgáltuk, amelyeknek fontos szerepet tulajdonítanak a hepatokarcinogenezisben.

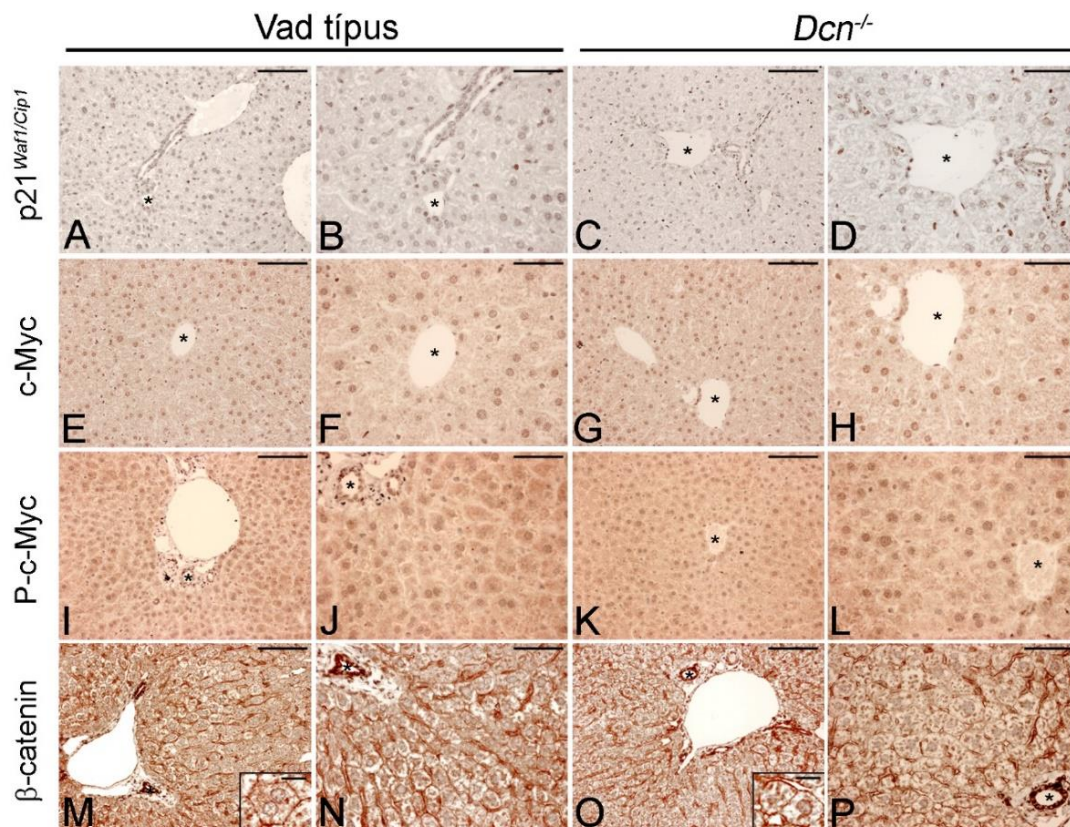
##### *IV. 2. 4. 1. c-Myc változásai*

Az egészséges májban a c-Myc gyenge immunpozitivitást mutatott mind a citoplazmában, mind a sejtmagban (20. ábra E-F). A decorin hiányos májakban azonban a c-Myc mennyisége közel 40%-kal emelkedett meg a vad típushoz képest normál körülmények közt is, karcinogénnel történő kezelés nélkül. ( $p < 0,01$ , 21. ábra A, C). Mind a TA, mind a DEN kezelés a c-Myc masszív sejtmagi akkumulációját okozta (23. ábra A-H), mindkét genotípus esetén úgy, hogy érdemi különbséget a tumorsejtek és a nem tumoros hepatociták között nem tudtunk kimutatni. Emellett, a TA-indukálta májtumorok esetén a vad típusú állatokban intenzív citoplazmatikus festődést is megfigyeltünk a tumorsejtekben, és az őket körülvevő cirrhotikus szövetben (23. ábra A-B), ami a decorin hiányos minták tumorsejtjei esetén nem volt megfigyelhető (23. ábra E-F). TA kezelésre a c-Myc 1,44-szoros emelkedését figyeltük meg Western bloton a vad típusú egerek májában, míg 1,87-szoros volt a növekedés a  $Dcn^{-/-}$  állatok májmintáiban (21. ábra A, C).

A DEN-indukálta tumorok esetén, vad típusú állatokban a citoplazmatikus c-Myc fehérjeszintje alacsonyabb volt, mint a környező szövetben (23. ábra C, D) és az immunreakció a decorin hiányos állatok mintáiban még alacsonyabbnak mutatkozott, mint a vad típusban (23. ábra G, H). A c-Myc fehérjeszint 1,1-szeres és 1,3-szoros változást mutatott a vad típusú, illetve a  $Dcn^{-/-}$  mintákban (21. ábra A, C).

A c-Myc változásának további nyomon követésére megvizsgáltuk a foszforilált c-Myc (Thr58) mennyiségét és lokalizációját. Az ebben a pozícióban történő foszforiláció ubiquitinilációs szignál is, amely végső soron a fehérje degradációjához vezet, és egyúttal meg is akadályozza a sajtmagi lokalizációt és aktivitást. Immunfestéssel erős

citoplazmás akkumulációt figyeltünk meg a vad típusú állatok tumoros és nem tumoros sejtjeiben egyaránt, a kezelés típusától függetlenül (23. ábra I-L). Ezzel szemben, a decorin hiányos tumorsejtek kevesebb foszfo-c-Myc-et tartalmaztak, mint az őket körülvevő szövet (23. ábra M-P). Ezeket az eredményeket a Western blot analízis is alátámasztotta, igazolva, hogy a  $Dcn^{-/-}$  állatok mintáiban a foszfo-c-Myc 78%-ban csökkent a kontrollban, 29%-ban a TA-kezelt állatokban, és 44%-ban a DEN-kezelt mintákban, a teljes c-Myc fehérjeszinthez vonatkoztatva (21. ábra A, 22. ábra A).

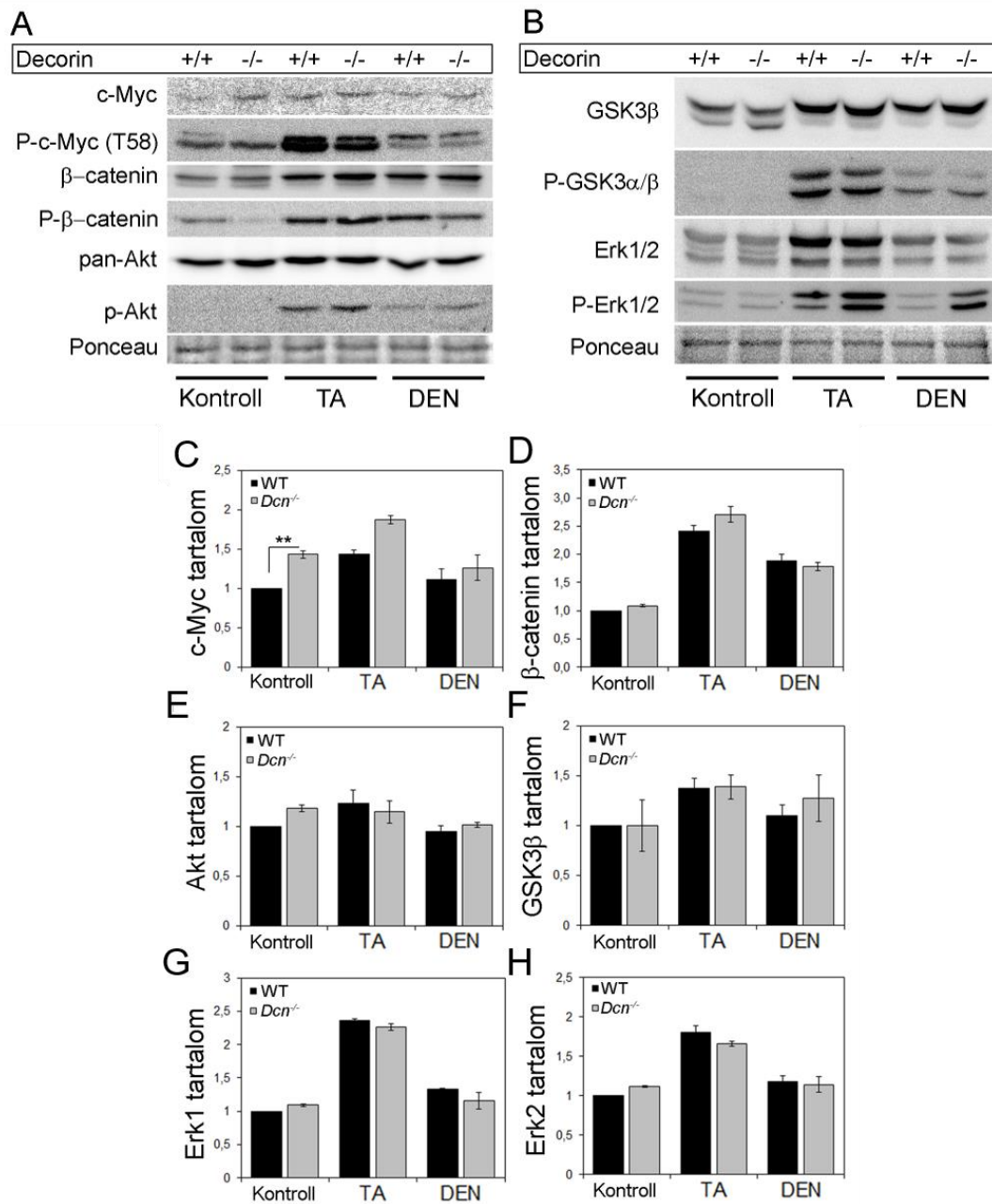


**20. ábra. p21<sup>WAF1/CIP1</sup>(A-D), c-Myc (E-H), foszfo-c-Myc (I-L) és β-catenin (M-P) immunhisztokémiai analízis vad típusú, és decorin hiányos ( $Dcn^{-/-}$ ) kezeletlen egerek májmintáin. A csillagok a metszetek ugyanazon pontját jelölik a különböző nagyításokon. Lépték=100 μm az A, C, E, G, I, K, M, O-ben és 50 μm a B, D, F, H, J, L, N, P-ben, valamint 10 μm az M és O sarkában lévő képeken.**

*IV. 2. 4. 2. A  $\beta$ -catenin szerepe*

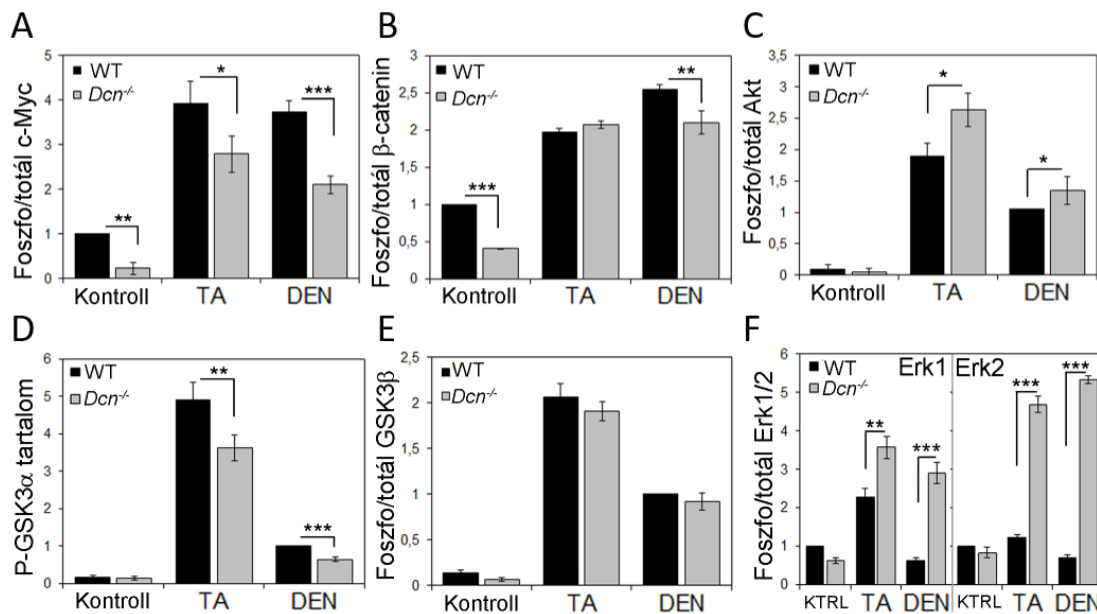
A  $\beta$ -catenint a hepatociták membránjában mutattuk ki mindkét genotípus esetén a kontroll, kezeletlen állatok májában (20. ábra M-P). A TA kezelés megnövelte a  $\beta$ -catenin mennyiségét; erős immunfestődést tapasztaltunk a cirrhotikus területeken, különösen a proliferáló epeutak mentén (23. ábra Q, R, U, V). Ugyanakkor, néhány kivételtől eltekintve, ahol a  $\beta$ -catenin citoplazmás, vagy gyenge magi lokalizációt mutatott, a legtöbb hepatocitában és tumorsejtben a  $\beta$ -catenin továbbra is a membránban lokalizálódott (23. ábra Q, R, U, V). Ezzel szemben a DEN-indukált májdaganatok esetén a fehérje jelentős transzlokációt mutatott a membránból a sejtmagba. Ezen felül megfigyeltük a citoplazmás immunpozitivitás emelkedését is (23. ábra S, T, W, X).





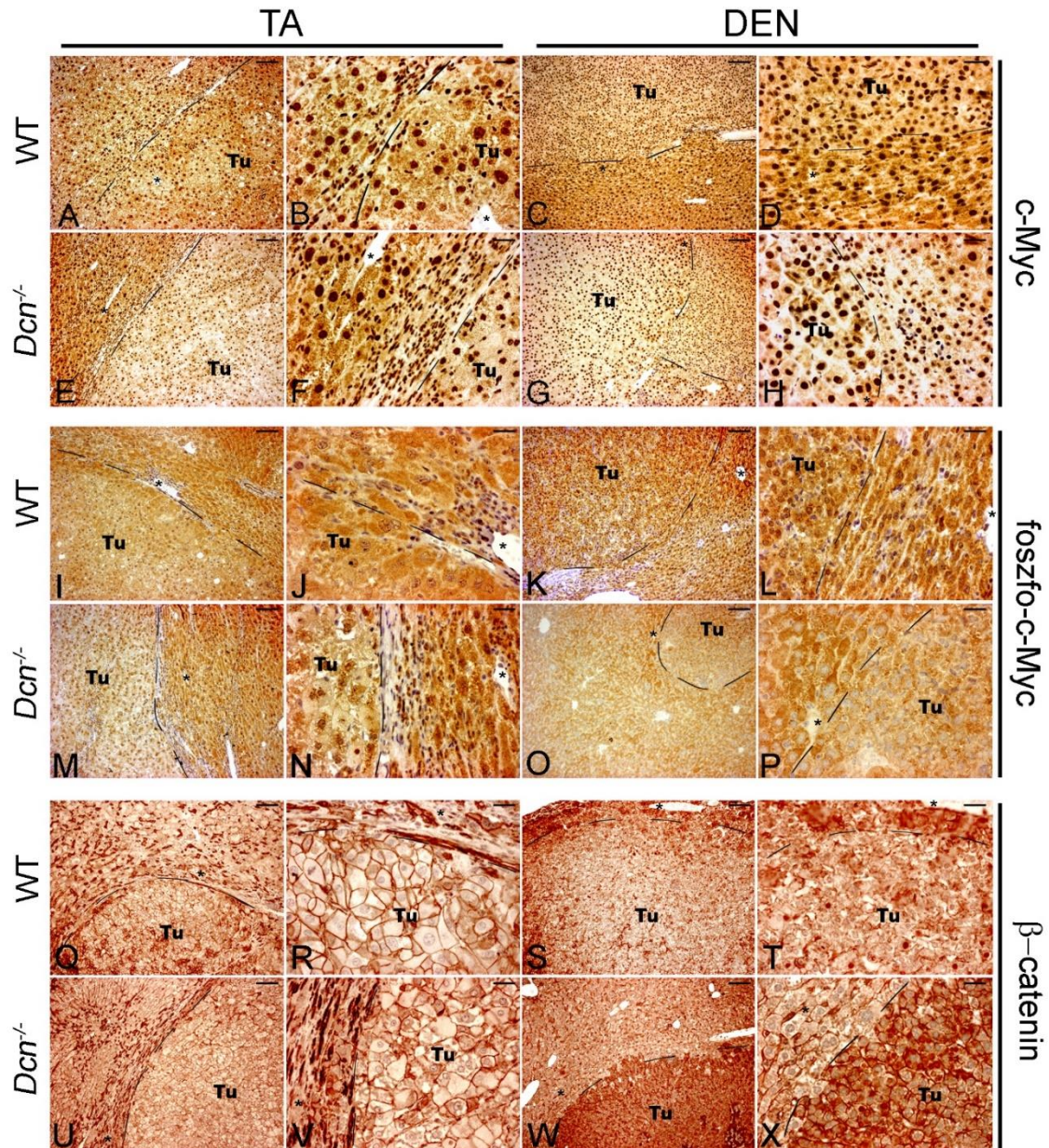
**21. ábra.** Reprezentatív képek a vizsgált, kitüntetett jelátviteli fehérjék Western blot analiziséből (A, B). Ponceau- festést használtunk betöltési kontrollként. A diagramok a c-Myc (C),  $\beta$ -catenin (D), Akt (E), GSK3 $\beta$  (F), ERK1 (G) és ERK2 (H) immunoblotok denzitometriás mérési eredményeit mutatják be Ponceau festéshez normalizálva a vad típusú (WT) és decorin hiányos (*Dcn*<sup>-/-</sup>) egerek májizátumaiból kezelés nélkül (Kontroll), valamint TA és DEN kezelést követően.

Az ábrázolt értékek a normalizált adatok átlaga  $\pm$  szórás. \*\* $p < 0,01$



**22. ábra. Kitüntetett jelátviteli fehérjék Western blot analízise. Az oszlopdiagramokon a vizsgált fehérjék relatív mennyisége látható a TA, és DEN kezelt vad típusú (WT), és decorin hiányos (*Dcn*<sup>-/-</sup>) állatokban a kezeletlen kontrollhoz képest (A-F). Az ábrázolt értékek a normalizált adatok átlaga ± szórás. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .**

A  $\beta$ -catenin, és az inaktivált, foszforilált-állapotának mennyiségét Western blottal határoztuk meg. A kontroll, kezeletlen májakkal szemben, mindkét kezelés során jelentős  $\beta$ -catenin összfehérjeszint növekedést tapasztaltunk (21. ábra A, D). A decorin hiányos mintákban szignifikánsan kevesebb inaktivált foszfo- $\beta$ -catenin-t tudtunk kimutatni, a kontroll, kezeletlen csoporthoz (1,0 vs 0,4,  $p < 0,001$ , 22. ábra B) és a DEN kezelt csoporthoz képest (2,6 vs. 2,1,  $p < 0,001$ , 22. ábra B). Ezzel szemben a TA kezelés során a *Dcn*<sup>-/-</sup> májak foszfo- $\beta$ -catenin szintje az össz- $\beta$ -catenin szinttel párhuzamosan emelkedett, így a foszfo/össz-  $\beta$ -catenin arány a vad típusú és a decorin hiányos állatokban is azonos maradt (22. ábra B).



23. ábra. Kitüntetett jelátviteli fehérjék immunhisztokémiai analízise vad típusú (WT) és decorin hiányos ( $Dcn^{-/-}$ ) egerek TA és DEN indukált májtumoraiban. Reprezentatív képek a c-Myc (A-H), foszfo-c-Myc (I-P) és  $\beta$ -catenin (Q-X) immunfestődéséről. Tu = tumor; a szaggatott vonalak a tumorhatárokat jelölik. A csillagok a metszetek ugyanazon pontját jelölik a különböző nagyításokon. Lépték = 100  $\mu$ m a A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S, U, és W-n, valamint 25  $\mu$ m a B, D, F, H, J, L, N, P, R, T, V, és X képeken.



#### IV. 2. 4. 3. *Az Akt aktivitása*

Az Akt szerepe a karcinogenezisben szerepet játszó jelátviteli folyamatokban jól ismert. Ennek megfelelően vizsgáltuk, hogy az Akt, vagy annak aktivált, foszfo-formái változtak-e kísérleti modelljeinkben. Figyelembe véve az összes kondíciót is feltételt, nem találtunk számottevő változást egy kezelési csoportban sem az össz-Akt mennyiségben a kontrollokhoz képest (21. ábra A, E). A kontroll mintákban a foszfo-Akt gyakorlatilag kimutathatatlan volt (21. ábra A, 22. ábra C). Ugyanakkor TA és DEN kezelésre a mennyisége drámaian megemelkedett (21. ábra A, 22. ábra C). Megjegyezendő, hogy a decorin hiányos tumorokban szignifikánsan magasabb foszfo-Akt szintet detektáltunk, mint a vad típusú mintákban; ~40% és ~29% a TA-, illetve DEN-indukált tumorokban (22. ábra C). Eszerint az Akt útvonal a decorin hiányában aktiválódik a kísérletes hepatokarcinogenezis során.

#### IV. 2. 4. 4. *A Glikogén szintáz kináz 3 $\beta$ (GSK3 $\beta$ ) szerepe*

A GSK3 $\beta$  fontos csomópontot képez számos jelátviteli útvonalban. Kísérletes modellünkben a GSK3 $\beta$  össz mennyisége nem változott a decorin hiánya miatt a kontroll, kezeletlen, és a TA-kezelt csoportokban, azonban a DEN-kezelés 16%-kal magasabb fehérjeszintet okozott a Dcn<sup>-/-</sup> állatokban a vad típushoz képest (21. ábra F). Western blottal vizsgáltuk az inaktivált, foszfo-GSK3 $\alpha$  és foszfo-GSK3 $\beta$  mennyiségét is (21. ábra B). Mind az  $\alpha$ , mind a  $\beta$  foszforilált, inaktív forma mennyisége megemelkedett a TA kezelés hatására (21. ábra B, 22. ábra D, E). A decorin hiányos állatok mája 27%-kal kevesebb p-GSK3 $\alpha$ -t tartalmazott, mint a vad típusú minták ( $p < 0,01$ , 21. ábra B, 22. ábra D). Ugyanezt a hatást láttuk a DEN-kezelés következtében is; a Dcn<sup>-/-</sup> mintákban 35%-kal volt kevesebb az inaktív p-GSK3 $\alpha$ , mint a vad típusú állatok mintáiban ( $p < 0,001$ ). Érdekes módon nem láttunk különbséget a p-GSK3 $\beta$  mennyiségében a genotípusok között egyik kezelés hatására sem, de a kontroll, kezeletlen mintákban sem. Ugyanakkor azt meg kell említeni, hogy a TA- és DEN kezelés is szignifikánsan megemelte a GSK3 $\beta$  fehérjeszintjét a kezelés nélküli csoporthoz képest (21. ábra B, 22. ábra E).

#### IV. 2. 4. 5. Az ERK1/2, mint kulcsszereplő

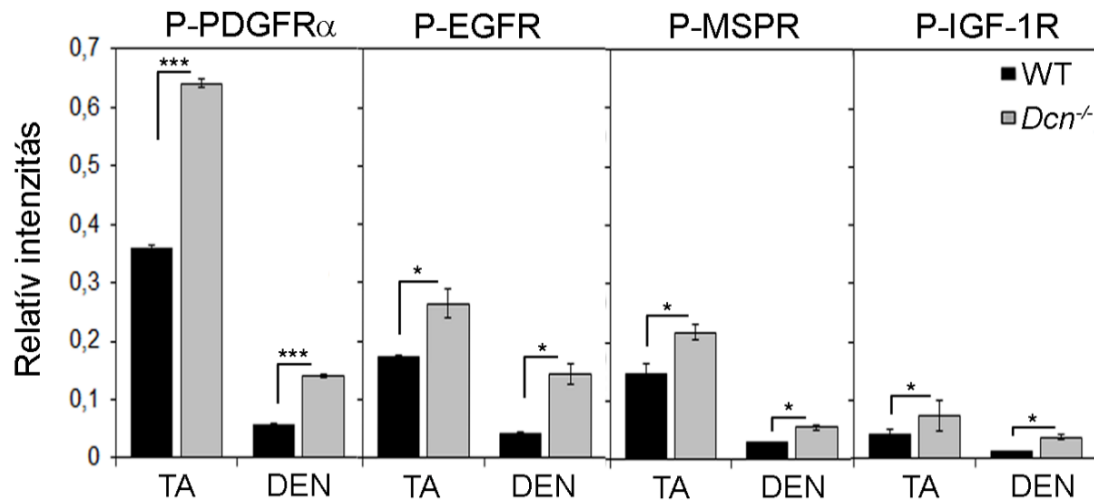
A leginkább szembevető változást az ERK1/2 fehérjék esetén detektáltuk. Az ERK1 és ERK2 összfehérje mennyisége 2,5-szörös és 1,7-szeres emelkedést mutattak TA-kezelést követően (21. ábra G, H). A DEN kezelés az ERK1/2 mennyiségét 1,2-szeresére növelte a kezeletlen csoporthoz képest. Szignifikáns különbséget a genotípusok között nem találtunk (21. ábra G, H). A vad típusú állatokban csak a TA-kezelés indukált ERK1/2 foszforilációt; a pERK1 szintet 2,3 illetve 3,6-szorosára, a pERK2-t 1,24 ill. 4,7-szeresére emelve a vad típusú és a *Dcn*<sup>-/-</sup> mintákban ( $p < 0,001$ , 22. ábra F). A DEN-kezelés nem volt hatással az aktivációra (21. ábra B, 22. ábra F). A DEN-kezelt vad típusú mintákkal ellentétben, a decorin hiányos egerekben ERK1/2 aktivációt mutattunk ki, 2,9-szeres és 5,3-szoros növekedést a p-ERK1 és p-ERK2 szintében ( $p < 0,001$ , 22. ábra F). Ennek megfelelően az ERK1/2 útvonal decorin hiányában folyamatosan aktivált.

#### IV. 2. 4. 6. Felerősödött receptor aktiváció a decorin hiányos egerekben

Ezt követően megpróbáltuk felderíteni azoknak a receptoroknak a szerepét és jelenlétét, amelyekről feltételeztük, hogy az imént említett jelátviteli útvonalakhoz kapcsolódhatnak. Ehhez foszfo-tirozin kináz receptor (RTK) array-t használtunk. Négy RTK-t azonosítottunk, nevezetesen a PDGFR $\alpha$ -t, az EGFR-t, az MSPR-t (más néven RON-t) és az IGF-IR-t, amelyek szignifikánsan magasabb szinten foszforilálódtak a decorin hiányában, mint a vad típusú körülmények közt (24. ábra). 1,8-szoros és 2,8-szoros növekedést detektáltunk a PDGFR $\alpha$  tirozin foszforilációjában *Dcn*<sup>-/-</sup> állatokban TA-, illetve DEN-kezelés esetén ( $p < 0,001$ , 24. ábra). A decorin hiánya 1,5-szörös és 3,6-szoros emelkedést váltott ki a p-EGFR szintjében TA- és DEN-indukált tumorokban ( $p < 0,05$ , 24. ábra). 1,4-szeres és 1,9-szeres növekedést figyeltünk meg az MSPR foszforilációjában decorin hiányos állatokban TA- és DEN-kezelések nyomán ( $p < 0,05$ , 24. ábra). Érdekes módon ugyan a c-Met receptor foszforilációja mindkét kezelés nyomán megemelkedett, a két genotípus között különbséget nem tudtunk kimutatni (nem szerepel az ábrán). A p-IGF-IR csak kis mennyiségben volt jelen a karcinogén-

indukált tumorokban; ugyanakkor a magasabb foszforiláltsági státusza a  $Dcn^{-/-}$  állatokban így is kimutatható a vad típusúakhoz képest ( $p < 0,05$ , 24. ábra).

Összességében, megfigyeléseink azt igazolják, hogy a decorin hiánya magasabb RTK aktivációt eredményez számos receptor esetén, ami végső soron elősegítheti a tumor növekedését.



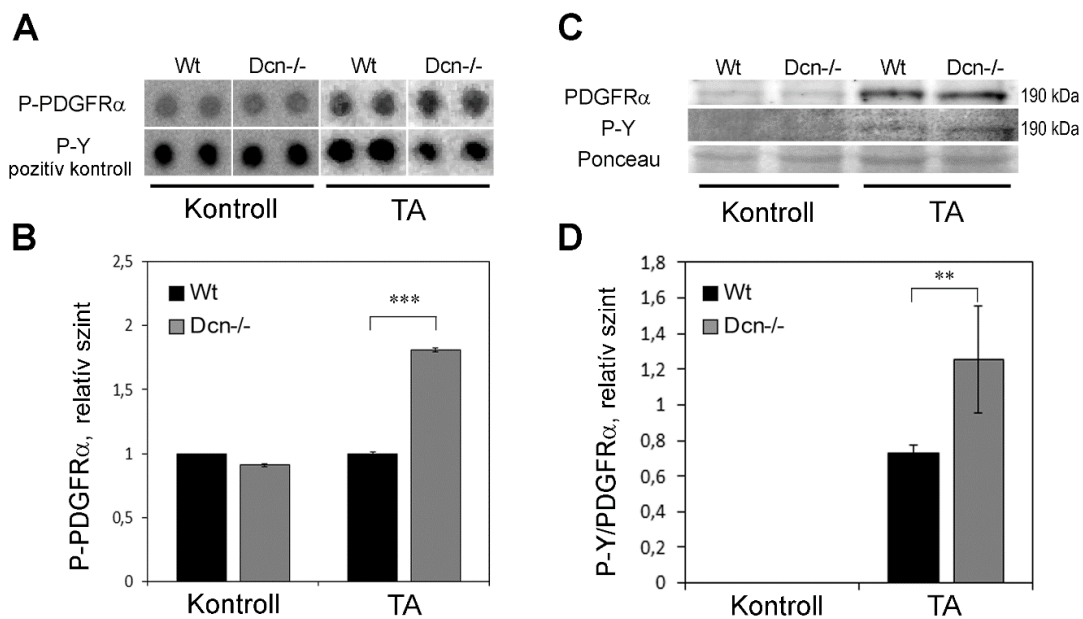
**24. ábra.** Változások az egyes tirozin kináz receptorok aktivitásában TA, és DEN kezelés következtében kialakuló, vad típusú (WT) és decorin hiányos ( $Dcn^{-/-}$ ) egerek májtumoraiban. Az oszlopdiagramok a foszfo-RTK array denzitometriás eredményeit ábrázolják, ahol a foszfo-PDGFR $\alpha$ -t, foszfo-EGFR-t, foszfo-MSPR-t és foszfo-IGF-IR-t a foszfo-tirozin pozitív kontroll pontokhoz normalizáltuk. Az ábrázolt értékek a mérési adatok átlaga  $\pm$  szórás. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

#### IV. 2. 4. 7. Decorin kapcsolata a PDGFR $\alpha$ receptorral

##### IV. 2. 4. 7. 1. A decorin hiánya megnövekedett PDGFR $\alpha$ aktivációt eredményez

Mivel a legmarkánsabb változást a pPDGFR mennyiségének változásában detektáltuk, ezért PDGFR $\alpha$  receptort vetettük további vizsgálatok alá. Ahogy azt az imént is láthattuk, a foszfo-PDGFR $\alpha$  növekedést mutatott a  $Dcn^{-/-}$  mintákban TA-kezelés hatására, a vad típusú mintákhoz képest ( $p < 0,001$ , 24. ábra, 25 ábra A, B). Ezen eredményünket Western blottal, és annak denzitometriájával validáltuk (25 ábra C, D). A vad típusú, és a  $Dcn^{-/-}$  kezeletlen, kontroll mintákban egyaránt alacsony

menyiségben tudtuk csak kimutatni a PDGFR $\alpha$  jelenlétét, különbséget a két genotípus között nem figyeltünk meg. Emellett a receptor foszforilációját sem figyeltük meg egyik kontroll csoportban sem (25 ábra C). A TA-kezelés mindkét genotípusban megnövelte a PDGFR $\alpha$  fehérjeszintjét, azonban a decorin hiányos állatokban a PDGFR $\alpha$  foszforilációja 1,8-szorosnak bizonyult a vad típusú egerekéhez képest ( $p < 0,01$ , 25 ábra D), igazolva ezzel a pRTK-array eredményeit.



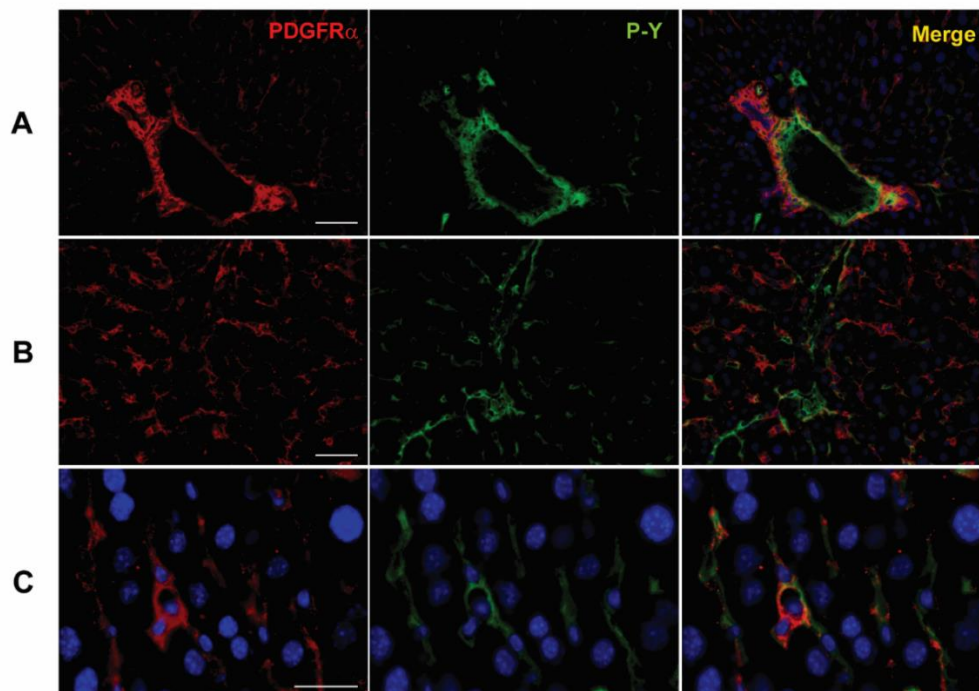
**25. ábra. Változások a PDGFR $\alpha$  és foszfo-PDGFR $\alpha$  szintjében TA indukált májtumorokban.**

Reprezentatív képek a foszfo-PDGFR $\alpha$  és foszfo-tirozin pozitív kontroll pontjairól a foszfo-RTK array-en a kezeltlen kontroll és TA kezelt állatok májából (A). Az oszlopdiagramok az array pontok denzitometriás kiértékeléséből származó adatokat ábrázolják, normalizálva az foszfo-tirozin kontroll pontokhoz (B). \*\*\* $p < 0,001$ . Reprezentatív képek a PDGFR $\alpha$  és az összfoszfo-tirozin Western blot-okból. Ponceau-festés használtunk betöltési kontrollnak. Megjegyzendő, hogy a PDGFR $\alpha$  és az összfoszfo-tirozin blotok esetén kettős immunjelölést alkalmaztunk a membránokon; ugyanazt a sávot mutatjuk az ábrán chemilumineszcens és fluoreszcens detektálást követően (C). Az oszlopdiagram a foszforilált PDGFR $\alpha$  szintjét mutatja be az receptor összemennyiségének arányában a Ponceau festéshez normalizálva (D). \*\* $p < 0,01$ .

IV. 2. 4. 7. 2. *A PDGFR $\alpha$  egészséges májban főleg a nem parenchyma típusú sejtekben lokalizálódik*

Ezt követően a PDGFR $\alpha$  szöveti és sejtszintű lokalizációját határoztuk meg egészséges, normál májban és a kísérletes, TA kezelt mintákon. Immunfestéssel nem találtunk különbséget a vad típus és a Dcn<sup>-/-</sup> állatok közt a PDGFR $\alpha$  lokalizációjában, foszforiláltságában, vagy mennyiségében, kezelés nélküli, normál körülmények között (26. ábra). A receptor expressziója periportális területeken volt jellemző (26. ábra A), de gyakran előfordult aszinuszoidálisan is (26. ábra B). Mivel kismértékű kolokalizációt lehetett kimutatni az összfoszfo-tirozin ellenanyaggal, ez arra enged következtetni, hogy normális körülmények között is van némi, alapszintű receptoraktiváció (26. ábra, A, B, C panelek, 'Merge' oszlop). A hepatociták felszínén nem lehetett kimutatni a receptor jelenlétét egyik genotípusban sem. Nagyobb nagyítással megfigyelhető, hogy a PDGFR $\alpha$  jellemzően az olyan nem parenchyma típusú sejtek membránjában található, mint a fibroblasztok, vagy myofibroblasztok (26. ábra C).



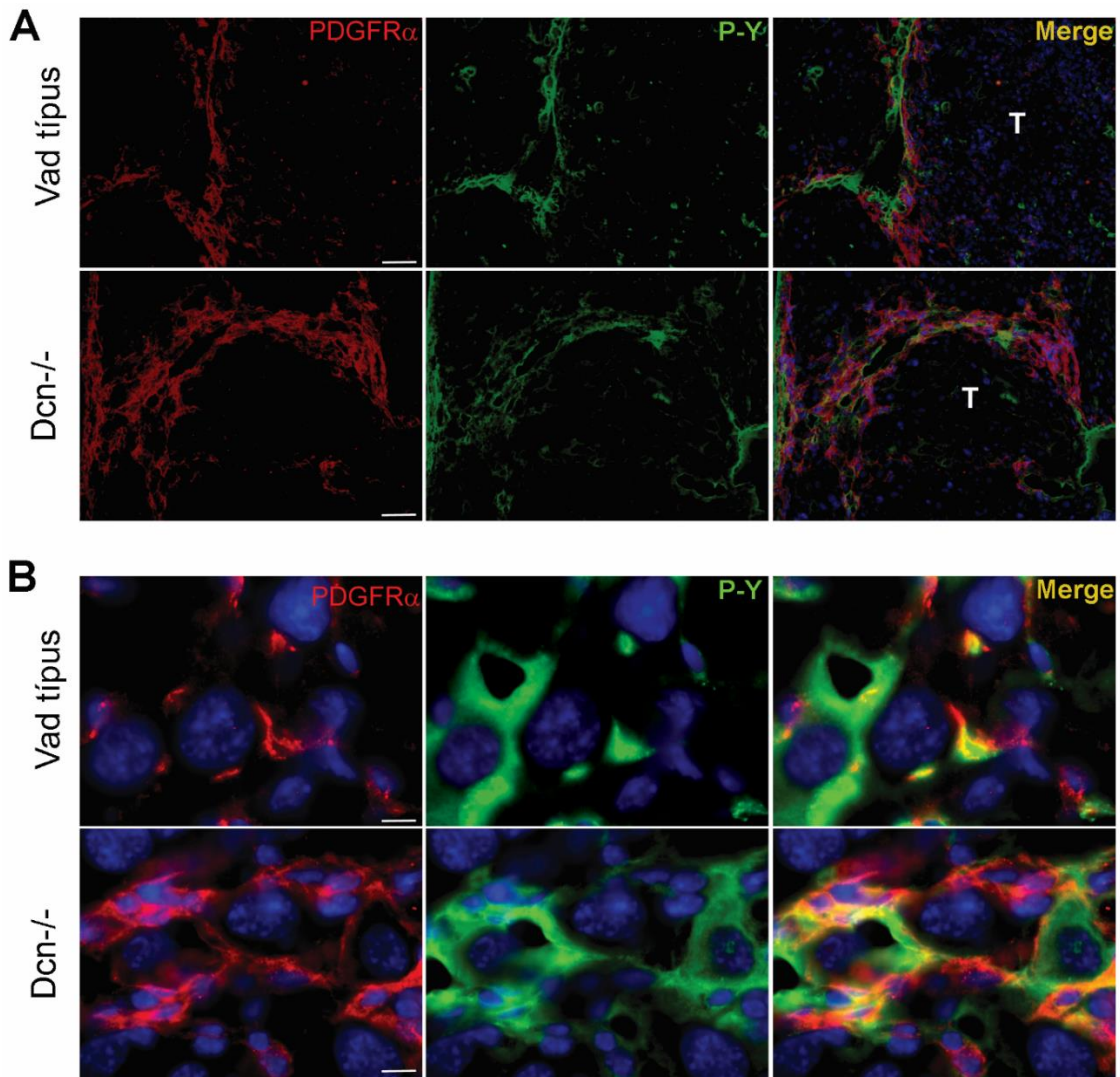


**26. ábra. PDGFR $\alpha$  lokalizációja normál májban. PDGFR $\alpha$  és foszfo-tirozin kettős immunfestés a máj periportális régiójában (A) és a lobuluson belül (B). A parenchyma területén (C) nem a hepatociták, hanem a non-parenchymalis sejtek mutattak immunpozitivitást. P-Y, foszfo-tirozin. Lépték = 100  $\mu$ m az A és B panelekben, és 50  $\mu$ m a C panelben.**

IV. 2. 4. 7. 3. *Megemelkedett PDGFR $\alpha$  szint, és megjelenése a hepatocitákon TA-kezelés hatására*

TA-kezelés hatására a PDGFR $\alpha$  mennyisége és foszforiláltsága is megemelkedik, ahogy azt immunfestés segítségével kimutattuk (27. ábra A). A receptor legnagyobb mennyiségben a cirrhotikus septum-okban, és a tumorok kötőszövetes tokjában volt megtalálható (27. ábra A). A decorin hiányos példányokban súlyosabb cirrhosist láttunk, mint a vad típusú egyedeknél, és ez összefüggésben volt a megnövekedett PDGFR $\alpha$  expresszióval és foszforilációval (27. ábra A). A daganatokon belül, a tumorsejtek felszínén nagyobb mértékben volt megfigyelhető a receptor a Dcn<sup>-/-</sup> mintákban, mint a vad típusúakban (27. ábra B). Összegezve, a TA-kezelés a PDGFR $\alpha$  receptor szintjének emelkedéséhez vezetett, megnövelve az aktivációs státuszát, és valószínűleg elősegítette a fehérje de-novo expresszióját, és sejtfelszínre jutását is a

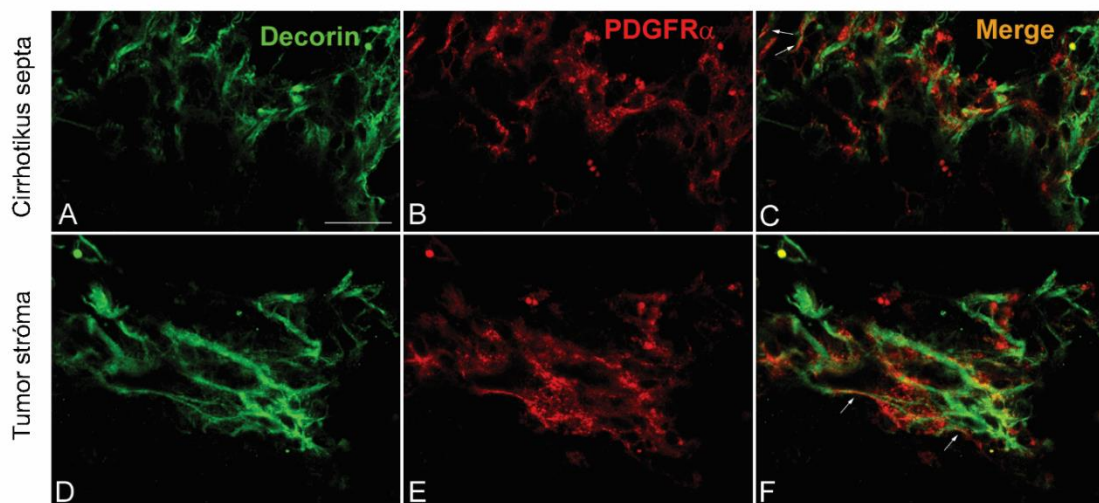
malignus sejtekben. Fontos kiemelni, hogy ezeket a megfigyeléseket főleg a decorin hiányos mintákon regisztráltuk, aminek alapján tovább erősíthető a decorin tumorgátló szerepe a máj karcinogenezisében.



**27. ábra.** PDGFR $\alpha$  lokalizációja TA-kezelt vad típusú és decorin hiányos (Dcn<sup>-/-</sup>) egerek májában. PDGFR $\alpha$  és foszfo-tirozin kettős immunfestés a máj cirrhotikus septum-aiban (A). Lépték = 100  $\mu$ m. Tumorsejtek a vad típusú és decorin hiányos (Dcn<sup>-/-</sup>) TA-kezelt májakban anti-PDGFR $\alpha$  (piros) és anti-foszfo-tirozin ellenanyagokkal (zöld) immunjelölve. P-Y, foszfo-tirozin; T, tumor. Lépték = 10  $\mu$ m.

IV. 2. 4. 7. 4. *A decorin nem kolokalizál a PDGFR $\alpha$ -val, de közvetlenül köti annak természetes ligandját, a PDGF-et*

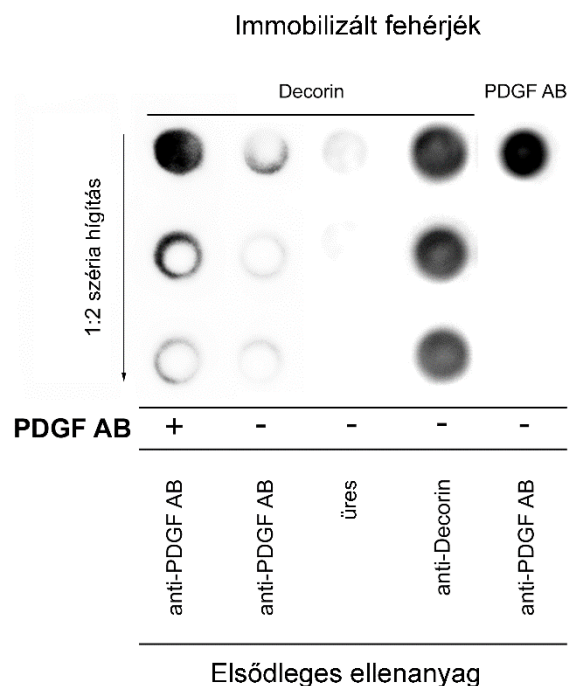
Ezek után azt vizsgáltuk, hogy a decorin vajon közvetlenül gátolja-e a PDGFR $\alpha$  működését. Ennek céljából kettős immunfestést végeztünk a mintáinkon, hogy megállapítsuk, az endogén decorin és a PDGFR $\alpha$  kolokalizálnak-e a vad típusú májokban, vagy sem. A vizsgálat megmutatta, hogy a decorin és a receptor nem kolokalizál a TA-kezelt vad típusú minták legtöbb részén, beleértve a már említett cirrhotikus, kötőszövetes septum-okat is (28. ábra A-C) és a tumorstrómát is (28. ábra D-F). Olyan immunfluoreszcens jelet, amely a decorin és a receptor együttes lokalizációjára utalhat csak kis mennyiségben tudtunk kimutatni (fehér nyilakkal jelölve a 28. ábra F-en).



**28. ábra. PDGFR $\alpha$  és decorin kolokalizációja cirrhotikus májtumorokban. PDGFR $\alpha$  és decorin kettős immunfestés a vad típusú egerek TA-kezelt májából készült metszeteken (A). Reprezentatív képek a decorin (zöld) és a PDGFR $\alpha$  (piros) immunreakciókról a cirrhotikus septum-okban (A-C) és a tumorstómában. Lépték = 100  $\mu$ m.**

Ezen megfigyelések alapján feltételeztük, hogy a kísérletes hepatokarcinogenezis modellünkben a decorin a korábban már bemutatott hatását másképp éri el, minthogy a receptorhoz közvetlenül kapcsolódna, és gátolná annak működését. Mivel a

kolokalizációt célzó kísérleteink nem adtak magyarázatot, hogy miért növekszik a PDGFR $\alpha$  aktivitás a decorin hiányos mintákban, megvizsgáltuk, hogy vajon a decorin képes-e közvetlenül kötni a PDGF ligandot. Immobilizált humán rekombináns decorint inkubáltunk PDGF AB-vel, majd PDGF AB specifikus antitesttel immunreakciót végeztünk. Ennek eredményeképp a decorint tartalmazó membránpontokon megjelent a PDGF specifikus jel (29. ábra), így megállapítottuk, hogy a decorin képes megkötni közvetlenül a PDGF-et.



**29. ábra. Decorin és PDGF AB közti interakció kimutatása. Humán rekombináns decorint (balról jobbra a pontok első négy oszlopa) és PDGF AB-t (balról jobbra a pontok utolsó oszlopa) immobilizáltunk membránon dot-blot analízishez. Az 1:2 széria hígításban rögzített decorin pontokat vagy PDGF AB-vel, vagy NaCl/Tris pufferrel (üres) inkubáltuk (balról jobbra az első három oszlop) majd PDGF AB specifikus ellenanyaggal mutattuk ki a megkötött ligandot. A membránhoz rögzített decorint anti-decorin ellenanyaggal jelenítettük meg, a PDGF AB-t pozitív kontrollként, pedig a már említett PDGF AB specifikus antitesttel.**

## V. MEGBESZÉLÉS

### V. 1. *In vitro* kísérletek eredményei

A humán rekombináns decorin gátló hatása a HepG2 sejtekre a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> [76] és p57<sup>KIP2</sup> indukcióján keresztül [77] már korábban publikálásra került. Így a HepG2 sejtvonalat mintegy belső kontrollként alkalmaztuk kísérleteinkben. Eredményeink a HepG2 sejtekben megegyeztek az irodalmi adatokkal.

A másik két vizsgált, differenciált hepatóma sejtvonalnál, a Hep3B-nél és a HuH7-nél, szintén igazoltuk a decorin kezelés proliferáció gátló hatását, bár ennek idő függése, és részletesebb jelátviteli vizsgálataink alapján a mechanizmusa is eltéréseket mutatott. A HLE sejtekben a decorin szignifikáns proliferáció gátló hatását nem tapasztaltuk.

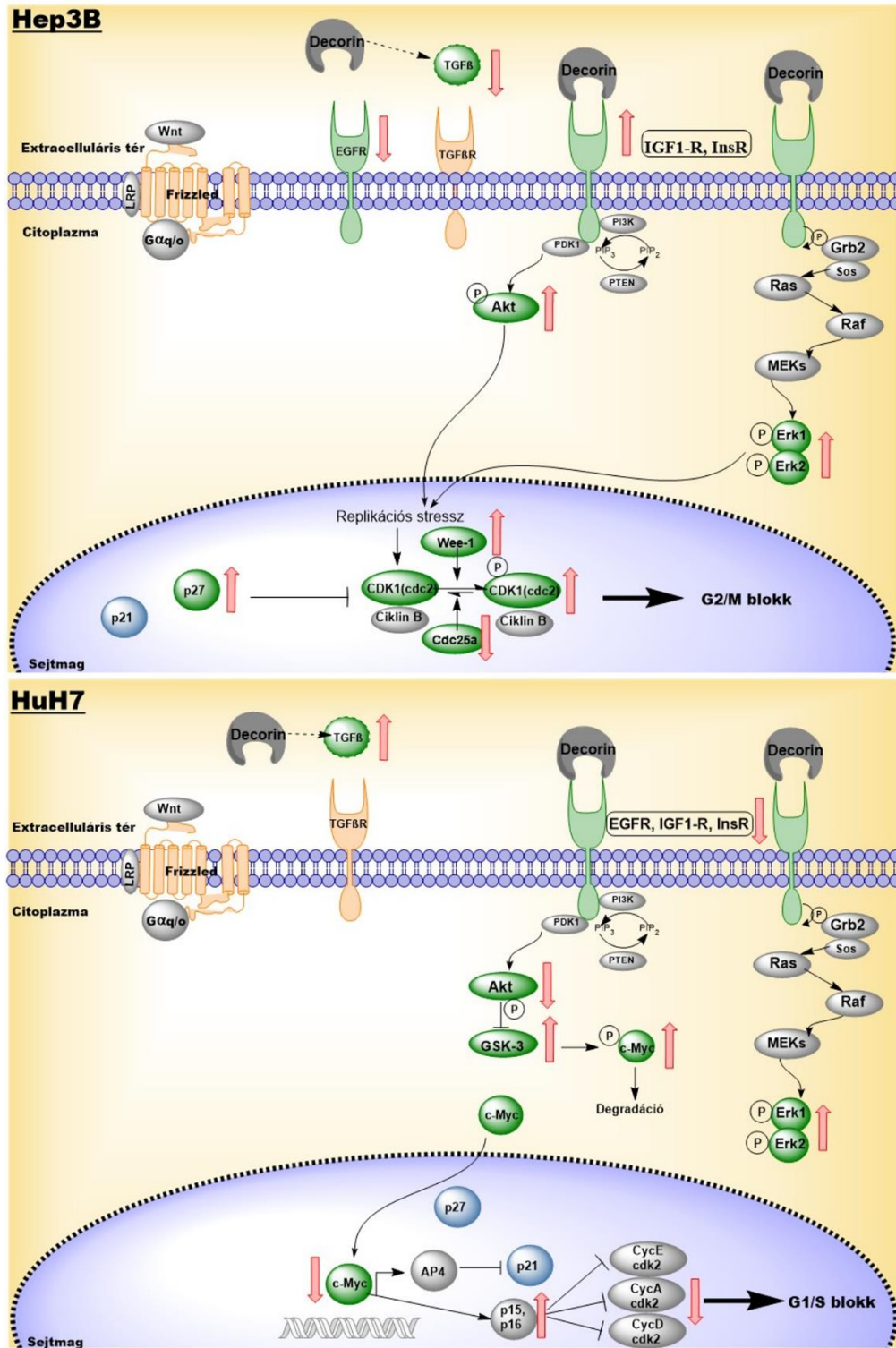
Ezek alapján a vizsgált sejtek egyedi decorin érzékenységet, és ezzel összefüggésben, más-más molekuláris változásokat mutattak.

A HepG2 sejtek proliferációját kísérleteinkben az EGFR szignál aktivitás stimulálta, amely igazolan közvetlen célpontja lehet a decorinnak [78]. Decorin kezelés hatására a receptor aktivációs állapotának csökkenését, és ezzel párhuzamosan ERK aktivitás csökkenést figyeltünk meg. Emellett, az előbbivel összefüggő, korábban már megfigyelt GSK3 $\alpha/\beta$  aktivitás fokozódást sikerült igazolni [79], valamint kimutattuk ennek következményeként a c-Myc és a  $\beta$ -catenin kijelölését proteaszóma általi lebontásra [80]. A  $\beta$ -catenin sejtmagba történő transzlokációjának csökkenését szintén megfigyeltük. A leírt molekuláris változások összefüggésben vannak a várt sejtciklus blokkal, és a decorin által kiváltott proliferáció gátlással (31. ábra).

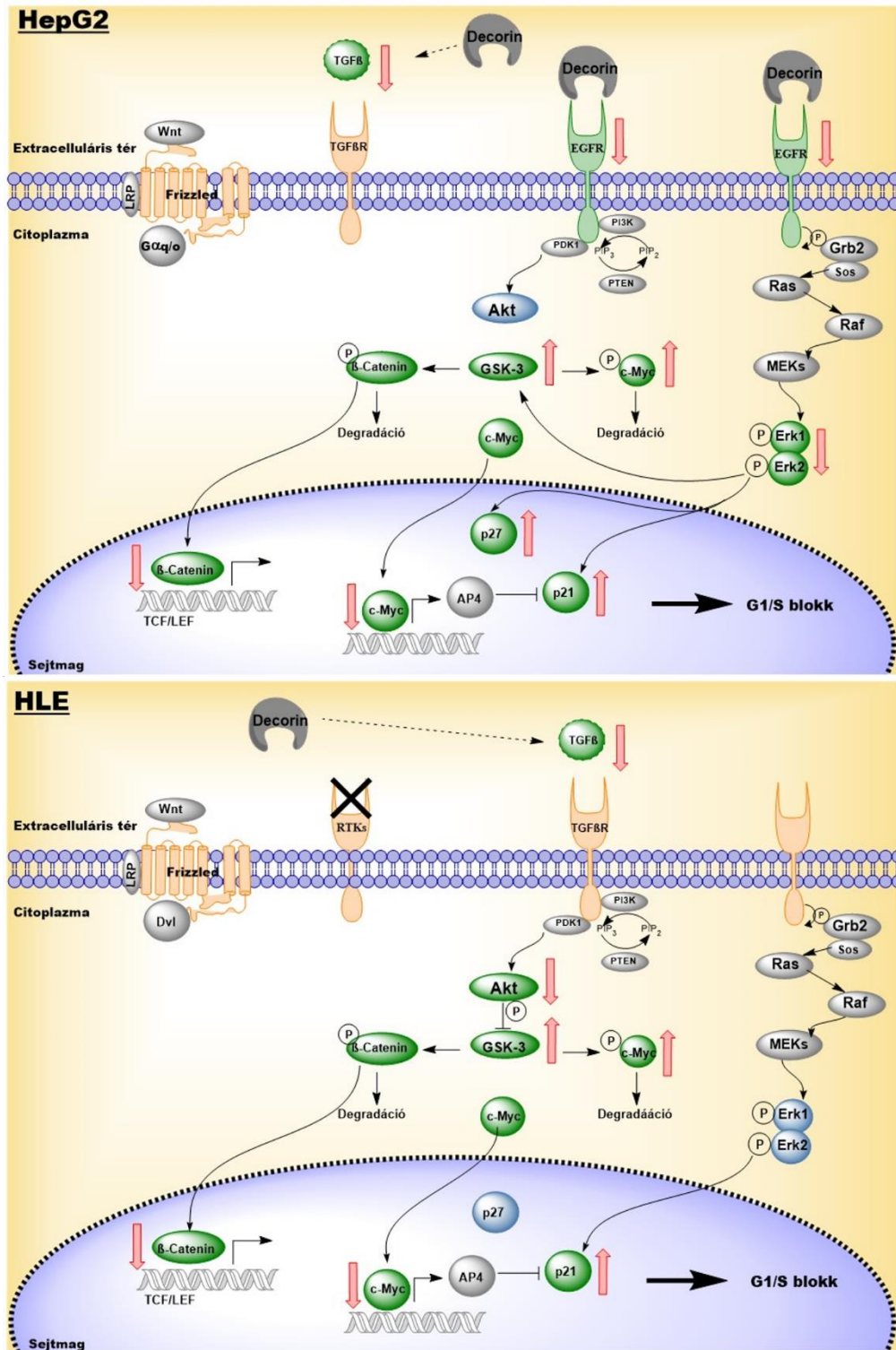
A Hep3B és a HuH7 eredményeink szerint EGFR aktivitástól független növekedést mutat, ezek a sejtek proliferációs aktivitásukat elsősorban az InsR és IGF-IR indukálta útvonalak aktivitásának köszönhetik. Ennek megfelelően az inzulin receptor (InsR) és az IGF-IR alap aktivitása mindkét sejtvonalban magasabb volt az EGFR-énél. Ez a Hep3B esetében a decorin expozíció hatására tovább nőtt, míg a HuH7 sejtekben gátlódott. A két sejtvonal közös jellemzője, hogy a TP53 tumor szupresszor gén mutáns. A Hep3B esetében ez egy deléciós mutációt jelent, míg a HuH7 sejtekben a p.Y220C pontmutáció jelenléte a mutáns fehérje túltermeléséhez, és onkogén aktivitásához vezet

[81]. Az elmúlt néhány év kutatásai rávilágítottak arra, hogy a p53 kulcsszerepet játszik a metabolizmus szabályozásában. Befolyásolja többek között a glikolízist, a mitokondriális oxidatív foszforilációt a pentóz-foszfát útvonalat, a zsírsav szintézist és oxidációt, melyek homeosztázisának fenntartása hozzájárul a p53 tumorszupresszor funkciójához is [82, 83]. A vad típusú p53 pedig gátolja az inzulin-receptor és az IGF-IR transzkripcióját [84] is, ami magyarázza e receptorok magas mennyiségét a p53 mutáns Hep3B és HuH7 sejtvonalakban. Mivel kísérleteinket szérummentes környezetben végeztük, felmerült a kérdés, mi aktiválhatja ezeket a receptorokat. Az irodalomból és a Cancer Cell Line Encyclopedia adatbázisából nyert információk alapján az általunk vizsgált négy sejtvonal közül a Hep3B termeli a legnagyobb mennyiségben az inzulin-receptor szubsztrátokat (IRS-ek), elsősorban az IRS-2-t [85]. A ligandok termelésének tekintetében második helyen pedig a HuH7 sejtvonal áll, de az IGF2 ligand relatív magas expressziója (a HLE-hez képest) is hasonló a két sejt esetén. Így mindkét hepatománál érthető, miért aktív alapállapotban az InsR és az IGF-IR.





30. ábra. Decorin hatása a jelátviteli folyamatokra Hep3B és HuH7 sejtekben *in vitro*. Az extracelluláris térben a decorin a sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódik, és ezzel olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, mint az Akt/GSK3 $\beta$ , vagy a Ras/MEK/ERK. A különböző sejtvonalak eltérő módon reagálnak a decorinra. (További magyarázatok a szövegben)



31. ábra. Decorin hatása a jelátviteli folyamatokra HepG2 és HLE sejtekben *in vitro*. Az extracelluláris térben a decorin a sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódik, és ezzel olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, mint az Akt/GSK3 $\beta$ , vagy a Ras/MEK/ERK. A különböző sejtvonalak eltérő módon reagálnak a decorinra. (További magyarázatok a szövegben)



Decorin kezelés hatására a Hep3B sejtekben az InsR és főleg az IGF-IR aktiválódott, amely erőteljes Akt, és kisebb mértékű MAPK foszforilációhoz vezetett. Mivel ezek az útvonalak általánosságban proliferációs jelet közvetítenek, így a megfigyelt, aktivált jelátviteli mediátorok a decorin sejtosztódást gátló hatásával ellentmondásban vannak. A decorin IGF-IR-re kifejtett aktivációja azonban nem ismeretlen jelenség, leírták már normál endothel sejtekben, vese fibroblasztokban és extravillózus trophoblasztokban is [86]. Tumorsejteknél azonban e folyamat eddig ismeretlen volt. Mivel a Hep3B sejtvonal erőteljesen differenciált, elképzelhető, hogy a differenciáltság mértékétől függően az IGF-IR-t a decorin aktiválja, mint azt normál sejtek esetében teszi, vagy gátolja, mint az a tumorsejteknél tapasztalható. Ezen felül, mivel az IGFBP kötőfehérjék ellentmondásos hatását korábban már kimutatták [87], így az is feltételezhető, hogy kötőfehérjék, és kapcsolatuk a receptorral, valamint lehetséges szerepük a decorin-receptor interakcióban a különböző sejtekben különböző hatást eredményez. A kérdés komplexitását fokozza, hogy a Hep3B sejtvonalban mind a retinoblasztóma, mind a p53 fehérje inaktív, ami támogatja a kontroll nélküli sejtosztódást [88]. Xiong és munkatársai megfigyelték az IGF-IR támogató szerepét a p53 által közvetített apoptózisban [89], míg Yoon és csoportja leírták, hogy az adenovírus által közvetített mesterséges decorin expresszió sejthalálhoz vezet a p53 aktivációján keresztül [90]. Lehetséges, hogy a decorin az IGF receptoron keresztül az apoptózist csak alacsony p53 szint mellett képes indukálni. Ez az elmélet magyarázhatja azt a megfigyelésünket, hogy miért tapasztaltunk a p53 deléciós mutáns Hep3B-nél IGF-IR aktivációt, a HuH7 esetében, ahol a mutáns p53 magasan expresszált, pedig receptor gátlást. Mivel a Hep3B sejtekben a retinoblastoma is mutáns, a sejtciklus gátlása a G1/S fázisnál nem történik meg, így a sejtek biztosan átlépnek a restrikciós ponton. Ismert jelenség, hogy a megnövekedett Akt aktivitás replikációs stresszhez vezethet, mely aktiválja az ATR/Chk1/Wee1 rendszert megállítva a sejtciklust a G2/M fázis átmenetnél a CDK1 foszforilációján keresztül [91]. Előbbieket sikerült igazolni a Hep3B sejtek esetében, ahol a decorin kezelést követően magas foszfo-Akt szint mellett emelkedett pCDK1 és Wee1, valamint csökkent Cdc25A expressziót mértünk, ami valószínűsíti az előbb említett mechanizmus működését. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a decorin nemcsak a G1/S fázis átmenetet képes gátolni, hanem sejttípus- és differenciáltsági állapot-függően blokkolhatja a sejtciklus tovább lépését a

G2-ből az M fázisba is (30. ábra). A decorin G2/M fázisban kifejtett hatása eddig teljesen ismeretlen volt, és további vizsgálatok szükségesek a pontos szignalizációs folyamatok felderítéséhez. Mindenesetre a decorin ezen új hatása tovább erősíti a proteoglikán tumorszupresszor szerepét.

A HuH7 sejtvonal esetében, a decorin kezelés csökkentette a foszfo-InsR, és a foszfo-IGF-IR mennyiségét. Emellett, hasonlóan a HepG2 és Hep3B sejtekhez, az aktív EGFR mennyisége is csökkent. A három receptor együttes gátlásával párhuzamosan pedig dózis-függő Akt szignál gátlást tapasztaltunk. Összefüggésben az Akt útvonal aktivitásának csökkenésével, a nagy dózisu decorin kezelés hatására szignifikáns csökkenést észleltünk a foszfo-GSK-k szintjében is, ennek megfelelően a foszfo-c-Myc mennyisége emelkedett. Ugyan sem a p21, sem a p27 expresszió változását nem figyeltük meg, a c-Myc deaktivációja azonban módosíthatja a sejtciklus előre haladását, például a p15<sup>INK4B</sup>, vagy p16<sup>INK4A</sup> expresszió fokozásán, illetve a ciklin A2, D2 és E2 gátlásán keresztül, amelyek mindegyike a c-Myc specifikus célpontja [92]. Ezek az eredmények és következtetések mind összhangban állhatnak a proliferáció gátló hatásokkal. A leginkább figyelemre méltó változás a HuH7 sejteken azonban az erőteljes ERK aktiváció volt (30. ábra). Bár első pillantásra meglepőnek tűnik, a jelenséget korábban leírták már ezen a sejtvonalon [93]. Az említett munkában a HuH7 sejtek ciszplatin kezelésre a foszfo-ERK1/2 mennyisége jelentősen megemelkedett. Az ERK foszforiláció végül apoptózishoz vezetett, így az aktív ERK1/2 molekulák tumorszupresszorként is hathatnak a HuH7 sejtvonalra. Jól ismert, hogy az ERK1/2 aktivitás szükséges lehet mind a proliferáció stimulálásához, mind a gátlásához, és az ERK1/2 aktivitásának a mértéke az, ami meghatározza, hogy az ellentétes hatások közül melyik érvényesül [94]. HepG2 sejtekben kimutatták, hogy nagy intenzitású ERK szignál közvetíti a HGF indukált proliferáció gátlást a retinoblastoma tumorszupresszor hipofoszforilációján keresztül. Lehetséges, hogy a decorin is képes ERK-közvetített úton apoptózist indukálni. Azonban a szignál transzdukció pontos mechanizmusának felderítéséhez még további vizsgálatokra van szükség.

A HLE a vizsgált HCC sejtvonalak közül a legkevésbé differenciált [95], amit erős vimentin pozitivitása is bizonyít. Ez lehet annak az oka, hogy még a kezeletlen kontroll sejteken sem találtunk aktív EGF receptort. Érdekes módon az általunk vizsgált receptorok közül egyetlen egy sem volt aktív a HLE sejtekben. Ennek fényében

érthetőbbé válik, miért tapasztaltunk csak csekély mértékű, nem szignifikáns proliferáció gátlást az MTT teszt segítségével. 72 óra után elképzelhető, hogy az antiproliferatív hatás kiváltásához ennél a sejtvonalnál több idő szükséges. Néhány intracelluláris jelátviteli molekula foszforilációjában azonban még így is mértünk változást. Két nap után, a decorin kezelés hatására a pAkt szintje szignifikánsan csökkent, hasonlóan a HuH7 sejtekhez, de receptor változás nélkül. A HLE sejtekben az aktív ERK1/2 mennyisége érdemben nem változott, de enyhe GSK3 $\beta$  aktivációt mértünk, mely az foszfo-c-Myc és a foszfo- $\beta$ -catenin emelkedésére magyarázatot adhat (31. ábra). A csökkent c-Myc szint a p21 indukcióját okozza, mely a többi megfigyelt molekuláris változással együtt proliferáció gátlást eredményezhet. Esetünkben ezek az események nem bizonyultak elegendőnek ahhoz, hogy 72 óra alatt blokkolják, vagy szignifikánsan lassítsák a sejtosztódást. Fontos megfigyelésünk, hogy a decorin a hatását a jól ismert sejtfelszíni receptor partnerei nélkül is közvetítheti. Ez jelentheti azt, hogy a decorinnak vannak olyan egyéb sejtfelszíni receptorai, vagy koreceptorai, amiket nem mértünk, vagy nem ismerünk (pl. szerin-treonin receptorok), és amelyek akár sejttípus specifikusak is lehetnek. Elképzelhető az is, hogy a sejtek felveszik a decorint, elkerülve a kanonikus kaveolin-közvetítette EGFR-hez kötött útvonalat, és a proteoglikán sejten belüli partnerei közvetítik a hatását. Mivel számos mesenchymalis eredetű sejt képes internalizálni a decorint [96, 97], így nem kizárt, hogy az inkább mesenchymalis fenotípusú HLE is rendelkezik decorinra specifikus endocitózis recepttorral.

A HLE sejtek viselkedésének mesenchymalis voltát tovább erősíti, hogy migrációra képesek, melyet a TGF $\beta$  kezelés tovább fokoz [98]. Mint korábban említettük, e sejtek vimentin pozitívak, nincsen rajtuk aktív RTK, valamint késői stádiumú HCC-ből származnak. Ezek alapján feltételezzük, hogy a sejtek már átestek epithelialis-mesenchymalis tranzíción (EMT). A HLE sejtek médiumában a decorin kezelés hatására a TGF $\beta$  mennyisége szignifikánsan csökkent, mely valószínűleg a sejtek migrációját is gátolja. A TGF $\beta$  kétarcú viselkedése a daganatokban jól ismert jelenség. Dzieran és munkatársai tíz különböző HCC sejtvonalon vizsgálták a TGF $\beta$  citosztatikus hatását [99]. Tanulmányukból kiderült, hogy a HepG2, Hep3B és HuH7 sejtek a TGF $\beta$  kezelésre proliferáció gátlással, illetve apoptózissal válaszolnak, a HLE sejtvonal azonban érzéketlen a növekedési faktor e hatásaira. Összehasonlító

vizsgálataik rávilágítottak arra, hogy azok a sejtvonalak reagálnak a kezelésre, melyekben a TGF $\beta$  és a Smad7 bazális expressziója alacsony. Ezzel szemben a magas alap TGF $\beta$  és Smad7 expresszióval rendelkező hepatómákban, mint pl. a HLE ez nem okoz változást. Mindezek arra engednek következtetni, hogy a korai stádiumú HCC-knél, ahol a tumor még nem termel saját TGF $\beta$ -t a citokin gátló hatású. Egy ponton túl azonban megindul az expressziója a tumorsejtekben, EMT-t vált ki és hozzájárul a daganat inváziójához. A Smad7 fokozott termelése pedig a növekedési faktor nem-kanonikus, Smad-független útvonalának aktivitására utalhat. Saját kísérletünkben a HuH7 kivételével, a decorin mindegyik hepatóma sejtvonalnál szignifikánsan csökkentette a TGF $\beta$  szintet. Mivel a vizsgálatokat szérumentes környezetben végeztük, a médiumban lévő TGF $\beta$  a tumorsejtekből származott. Ugyan a mesterséges TGF $\beta$  kezelésnek van proliferációt gátló hatása a HepG2 és Hep3B sejtekre, azt nem tudjuk, hogy a saját maguk által termelt növekedési faktor is rendelkezik-e ezzel a hatással. Ha jelen van is, nyilvánvaló, hogy a decorin egyéb útvonalakon (pl. RTK-k blokkolásával) kifejtett osztódást gátló hatása felülírja ezt a programot. Az viszont bizonyos, hogy a TGF $\beta$  szint csökkentésével a proteoglikán gátolhatja az EMT-t, illetve az ezen átesett sejtek esetében pedig akadályozhatja a citokin tumor promóciós hatását.

## V. 2. Állatkísérletek eredményei

Azokra a korábbi megfigyelésekre alapozva, miszerint a decorin hatással van egyes növekedési faktor/receptor interakciókra, és így a sejtciklus szabályozására, feltételeztük, hogy a decorinnak fontos szerepe lehet a kísérletes hepatokarcinogenezis során is. *In vivo* munkánk során TA és DEN karcinogéneket használtunk a primer hepatocelluláris karcinóma indukálásához, amelyek jól ismert vegyületek a hepatokarcinogenezises kísérletekben. Ezek hatásait saját kísérleteinkben vizsgáltuk molekuláris szinten.

TA-kezelés hatására megemelkedik az alfa-foetoprotein (AFP) szintje, míg a DEN-kezelt tumorok esetén a magas glutamin-szintetáz (GS) expreszió és  $\beta$ -catenin aktiváció a jellemző [100]. A  $\beta$ -catenin mutációja és/vagy transzlokációja a sejtmagba [101], valamint az AFP expresszió reaktivációja [102] tipikus, az irodalom számára jól ismert eseményei a hepatokarcinogenezisnek. Lee és mtsai 19 különféle hepatóma

sejtvonal vizsgálatával rámutattak arra, hogy az AFP-pozitív és a  $\beta$ -catenin mutáns tumorsejtek két külön klaszterbe oszthatók a HCC-ken belül, megerősítve az AFP és GS expresszió növekedéses megfigyeléseinket a TA és DEN kísérletekben [103]. A jelátviteli útvonalakban szereplő kulcsmolekulák változásai a két különböző hepatokarcinogenezis modellben szintén alátámasztják a két különböző típusú hepatocelluláris karcinóma meglétét. Összességében, úgy tűnik, hogy a TA-indukált tumorok jellemzően a RTK/Ras/MAPK útvonalat aktiválják, míg a DEN-kezelés inkább  $\beta$ -catenin aktivációt eredményez. Ez a klaszterekbe sorolhatóság egyébként szépen egybevághat a saját *in vitro* megfigyeléseinkkel is. A TA kezelésnek megfelelő AFP pozitív sejtek Lee publikációja alapján a Hep3B, HepG2, és HuH7, amelyeknél tirozin kináz receptorokon keresztüli szignalizációt tapasztaltunk decorin kezelés hatására, a HLE pedig a másik, GS pozitívnek megfelelő klaszterbe tartozik, ahol mi sem láttunk RTK aktivitás változást, de  $\beta$ -catenin poszforilációt megfigyeltünk.

Munkacsoportunk korábban megfigyelte, hogy a decorin a fibrotikus septum-okban halmozódik fel [34], új megfigyelésünk ugyanakkor, hogy a tioacetamid indukálta tumorok körül és a strómában szintén kimutatható. A decorin hiánya a hepatokarcinogenezis ezen típusában fokozta a tumorképződést. Ezzel párhuzamosan fel akartuk deríteni, hogy a decorin hiánya kivált-e hatást olyan tumorok esetén is, amelyek DEN-kezelés nyomán képződtek. Ebben a kísérleti rendszerben a decorin mérsékelten fokozta a tumor prevalenciát, és a tumortérfogatot, bár jóval kevésbé kifejezett módon, mint ahogy a TA-indukált HCC-k esetén.

A vad típusú állatokban nemcsak a decorin mennyisége emelkedik meg a HCC-s májakban, de minőségi változást is tapasztaltunk a decorin glikanációjában, ami valószínűleg hosszabb dermatán/chondroitin szulfát oldalláncot jelent az N-terminuson. Ismert, hogy a decorin egyedüli glükózaminoglikán oldallánca az öregedéssel rövidül [104]. Ennek megfelelően elképzelhető, hogy a megfigyelt, hosszabb oldalláncok megjelenése a TA-kezelt tumorokban egy a magzati szöveti környezethez hasonlatosabb, primitívebb, dedifferenciáltabb állapot kialakulását jelzi.

Függetlenül attól, hogy melyik karcinogént használtuk, minden esetben fokozott tumorképződést figyeltünk meg a decorin hiányos állatok májában, amely kapcsolatba hozható a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> CDK inhibitor csökkent mennyiségével [105, 106]. Utóbbi változások és mRNS- és fehérje szinten is detektálhatóak voltak. Az jól ismert, hogy a

szolubilis decorin vázfehérje a legtöbb esetben EGFR és Met receptorokon keresztül aktiválja p21<sup>WAF1/CIP1</sup> fehérjét és így idézi elő a tumorszupresszor hatást [41, 54, 76, 107]. Modellünkben a decorin hiánya miatt kialakult, jóval alacsonyabb p21<sup>WAF1/CIP1</sup> szint CDK4 aktivitás növekedést okozott, ahogy arra a fokozott foszforiláció is utal a retinoblasztóma Ser780-as pozíciójában. Mindeközben a CDK2 aktivitás változatlan maradt a decorin-deficiens állatok neoplasztikus májaiban. Ennek megfelelően, az egerekből származó kísérletes eredményeink összhangban vannak a korábbi megfigyelésekkel, amelyek a humán HCC-ben a CDK4/CiklinD komplex aktivitásak növekedéséről számolnak be [108-110].

A Dcn<sup>-/-</sup> tumorokban megnövekedett az AP4 transzkripciós faktor expressziója is, ami ismert inhibitora a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> fehérjének [111]. Az AP4 expressziójának növekedése magyarázza a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> mennyiségének lecsökkenését. Ezt követően megvizsgáltuk a c-Myc fehérje szöveti-, és sejtszintű eloszlását is, amely számos tumor esetén központi szerepet játszik a proliferáció szabályozásában. A c-Myc vizsgálatát az indokolta, irodalmi adatok szerint a szolubilis decorin, és a decorin vázfehérje lecsökkenti a protoonkogén c-Myc mennyiségét különféle daganatokban, például orthotopikus emlőkarcinóma xenograftokban is [35, 36, 107]. Ezen korábbi megfigyelésekkel összhangban jelentős c-Myc felhalmozódást figyeltünk meg a TA- és DEN-indukált Dcn<sup>-/-</sup> tumorok sejtmagjaiban, párhuzamosan a c-Myc defoszforilációjával a Thr58-as pozícióban, amely proteaszómás degradációs szignálként destabilizálhatná a c-Myc fehérjét [107]. Ezen felül, a c-Myc a  $\beta$ -catenin 'downstream' célpontja [112], amelynek kiemelt szerepet lehet tulajdonítani a hepatokarcinogenezisben. Kísérleteinkben a  $\beta$ -catenin membránból sejtmagba történő transzlokációját figyeltük meg a DEN-indukált daganatok esetén, emellett a GS expresszió növekedése is a  $\beta$ -catenin útvonal szerepét hangsúlyozza. Ezzel szemben, utalva a két hepatokarcinogén szer különböző hatásmechanizmusaira, a TA-kezelt mintáinkban szignifikáns változást nem tapasztaltunk a  $\beta$ -catenin lokalizációjában, és a GS mRNS expresszió sem emelkedett. Megjegyezendő, hogy a kanonikus Wnt jelátvitel mellett a  $\beta$ -catenin aktiválása más útvonalakon, például olyan tirozin kináz receptorokon keresztül is megvalósulhat, mint a c-Met [107], RON [113], vagy EGFR [114].

A decorin képes megváltoztatni a jelátvitelt a növekedési faktorok vagy azok sejtfelszíni receptorainak megkötésével. Ilyen receptorok az EGFR [53, 56, 115], az IGF-IR [36, 57], valamint a c-Met [58]. Ezen felül, eredményink azt mutatták, hogy a PDGFR $\alpha$  aktivitás jelentősen megemelkedik TA-kezelés hatására a decorin hiányos egerek májában [116]. A kiterjesztett hepatokarcinogenezises kísérletekben, amikor a TA mellett a DEN karcinogént is felhasználtuk, négy tirozin kináz receptor foszforilációjának szignifikáns növekedését mutattuk ki (nevezetesen a PDGFR $\alpha$ , EGFR, RON, és IGF-IR receptorokét), függetlenül attól, hogy melyik karcinogént használtuk. Ezen receptorok közül néhány szerepe már korábban is ismert volt a humán HCC progressziójában [117-122]. Meglepő módon nem tapasztaltunk foszforilációváltozást a c-Met receptoron a decorin-deficiens tumorokban, annak ellenére, hogy a decorin és a c-Met bizonyított interakciója alapján erre számítottunk volna. Ugyanakkor modellünkben felfedeztünk egy új RTK-t, amely korábban nem volt köthető a decorin biológiai hatásához, az MSPR-t, vagy más néven RON-t, amely egy HGF-szerű ligand receptora. Azért is érdekes a megfigyelés, mert a RON-t kapcsolatba hozzák a humán HCC fejlődésével és progresziójával [123, 124].

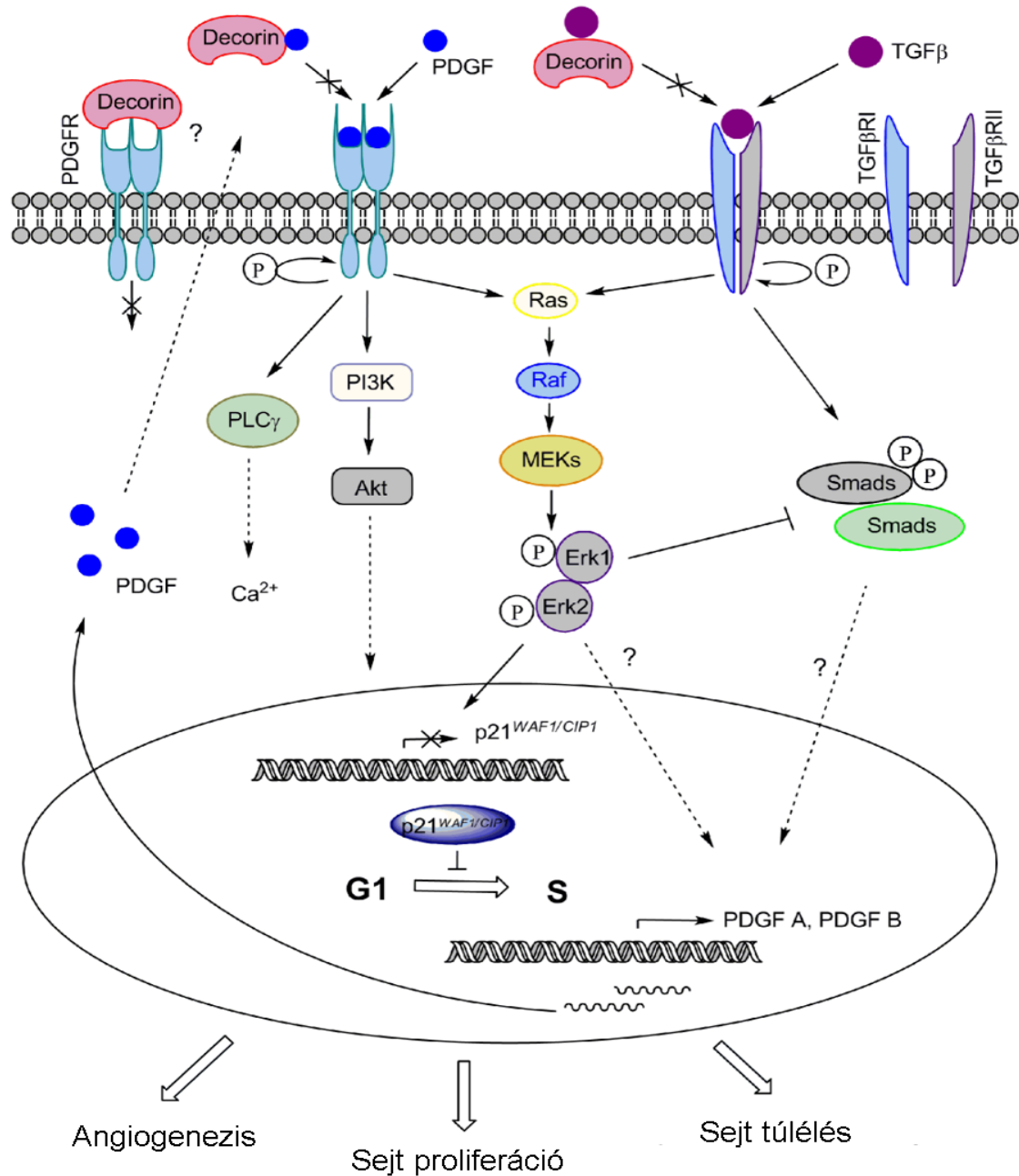
Mindezen felül, eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a PDGFR $\alpha$  receptor, amelynek kapcsolata a decorinnal eddig ismeretlen volt, szintén összefüggésbe hozható ezzel a proteoglikánnal. A PDGFR $\alpha$  teljes és aktivált mennyisége is megemelkedett a Dcn<sup>-/-</sup> állatok májában a hepatotoxikus kezelések hatására. A receptor felhalmozódását a cirrhotikus septum-okban és a tumorstromában egyaránt megfigyeltük. Megjegyezendő, hogy a fokozott PDGF szignál aktivitás olyan további fibrotikus betegséggel is összefüggésbe hozható, mint a tüdő-cirrrosis, scleroderma, glomerulosclerosis, és a cardialis fibrosis [119]. Munkacsoportunk korábbi megfigyelése, miszerint a decorin hiánya fokozott májfibrosist okoz [34], magyarázatul szolgálhat a megemelkedett PDGFR $\alpha$  szintre a Dcn<sup>-/-</sup>, cirrhotikus májakban. A PDGFR $\alpha$ -nak nemcsak a tumor angiogenezisben van fontos szerepe, de közvetlenül képes stimulálni a tumorsejtek proliferációját is [117, 119]. A receptor az egészséges felnőtt állatok hepatocitáiban nem mutatható ki, mivel számottevő expressziója a fejlődés során megszűnik, és nem marad aktivált, foszforilált PDGFR $\alpha$  a májsejteken [117]. Ennek megfelelően mi sem tudtuk kimutatni a receptor jelenlétét sem a vad típusú, sem a decorin hiányos kezeletlen, kontroll mintáinkban. Azonban a TA-kezelés

hatására megjelent a PDGFR $\alpha$  a tumorsejtek membránjában, és a Dcn<sup>-/-</sup> mintákban nagyobb mennyiséget és foszforiláltságot tapasztaltunk, mint a vad típusú minták esetén. Ez az eredmény összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy mind a teljes, mind az aktivált PDGFR $\alpha$  mennyisége megemelkedik HCC sejtvonalakban, és resectios tumormintákban, ahol a magasabb receptor szint agresszívabb sejtvonallal, illetve rosszabb prognózissal társul [117]. Mindemellett, a PDGFR $\alpha$  monoklonális antitest-kezelés gátolja a túlélést és a proliferációt számos humán és egér sejtvonalban, beleértve HCC vonalakat is [117, 125, 126]. Ennélfogva, túl azon, hogy a PDGFR $\alpha$  kiemelt szerepet tölt be a HCC-k angiogenezisében, fontos szerepe lehet a proliferáció és a túlélés szabályozásában is, így a receptor ígéretes célponttá válhat a célzott tumorterápiás megközelítések számára.

A decorin hatásának feltárásához kettős immunfestést alkalmaztunk a mintáinkon, amelyeken a decorint és PDGFR $\alpha$ -t fluoreszcensen jelöltük. Meglepő módon csak kismértékű, fokális kolokalizációt tapasztaltunk a vad típusú minták cirrhotikus területein és a tumorstómájában. Ennek alapján jutottunk arra a feltételezésre, hogy a decorin a PDGF receptorra nem közvetlen módon hat, ellentétben más RTK-hoz. Ismert, hogy a decorin növekedési faktorokat képes kötni, ami főleg a fehérjeváz leucinban gazdag régiójának köszönhető. Ez szolgál dokkoló reservoir-ként az RTK-k számára is az extracelluláris mátrixban [74]. Ilyen közvetlen interakciót már bemutattak a TGF- $\beta$ 1-gyel, amelynek következménye a növekedési faktor hatásainak gátlása [52]. Így azt feltételeztük, hogy mivel számottevő közvetlen kapcsolat a PDGFR $\alpha$  és a decorin között nem igazolható, a decorin a receptor természetes ligandját köti meg, amellyel visszatartja a növekedési faktort, hogy a PDGFR $\alpha$ -hoz kössön, ezzel pedig csökkenti annak aktivációját. Ezt az indirekt hatást sejtmentes *in vitro* vizsgálatban is megerősítettük. További kísérletekre lesz szükség annak tisztázására, hogy a decorin áll-e közvetlen kapcsolatban a PDGFR-rel, vagy sem. Eredményeink ugyanakkor összhangban vannak a megfigyeléssel, miszerint a decorin megköti PDGF BB-t, ezzel potenciális gátlószere a ballonos angioplasztikát követő intima hyperpláziának [127]. Továbbá, munkacsoportunk korábbi, oligoarray hibridizációs vizsgálata rámutatott (K. Baghy, R.V. Iozzo és I. Kovalszky, nem publikált adat), hogy mRNS szinten a PDGF A és PDGF B expressziója megemelkedik a Dcn<sup>-/-</sup> állatok mintáiban TA-kezelést követően a vad típushoz képest. Azt egyelőre nem tudjuk, hogy a decorin vajon képes-e a PDGF



AB-n és BB-n kívül más PDGFR ligandokat is megkötni (mint az AA vagy CC), ennek felderítése további vizsgálatokat tesz indokolttá. Korábbi eredményeink azt is igazolták, hogy a decorin hiánya fokozza a TGF- $\beta$ 1 hatékonyságát a májfibrosis kialakulása során [34]. Ennek megfelelően a TGF- $\beta$ 1 dózisfüggő módon növeli a PDGF B mRNS expressziót [128], továbbá, hepatociták epithelio-mesencymalis tranzícióját vizsgáló *in vitro* kísérletekben a PDGF A, valamint a PDGFR $\alpha$  és - $\beta$  expressziója is megemelkedett TGF- $\beta$ 1 kezelés hatására [129]. Ezen felül, a PDGF képes autokrin módon, saját expressziójának indukciójára is ERK1/2-en keresztül [130]. Korábbi tanulmányunkban szerepel, hogy a decorin hiányos állapot az aktivált foszfo-ERK1/2 mennyiségi növekedéséhez vezet [34]. Mindezt összegezve, lehetséges, hogy a decorin hiánya magasabb TGF- $\beta$ 1 aktivitást, ennek mentén pedig PDGF 'overexpressziót' okoz, amely aztán képes biztosítani saját termelődését (32. ábra). További lehetséges mechanizmusok is közre játszhatnak a decorin és a PDGF termelődés viszonyában. Például a PDGF B expressziója fokozódik a Wnt/ $\beta$ -catenin jelátvitel aktivációjakor [131], a decorin pedig közismert gátlószere ennek a fontos útvonalnak [35, 107]. Mindezek alapján azt gondoljuk, hogy amikor a decorin hiányzik a rendszerből, és így nem képes megkötni a PDGF ligandot, amivel funkciójában visszatarthatná, a növekedési faktor termelődése megnövekszik. Az extracelluláris térben felhalmozódó PDGF így nagy mennyiségben, szabadon kapcsolódhat annak receptorához. Ezek az események végül a PDGF receptor megnövekedett aktivitásához vezetnek (32. ábra).

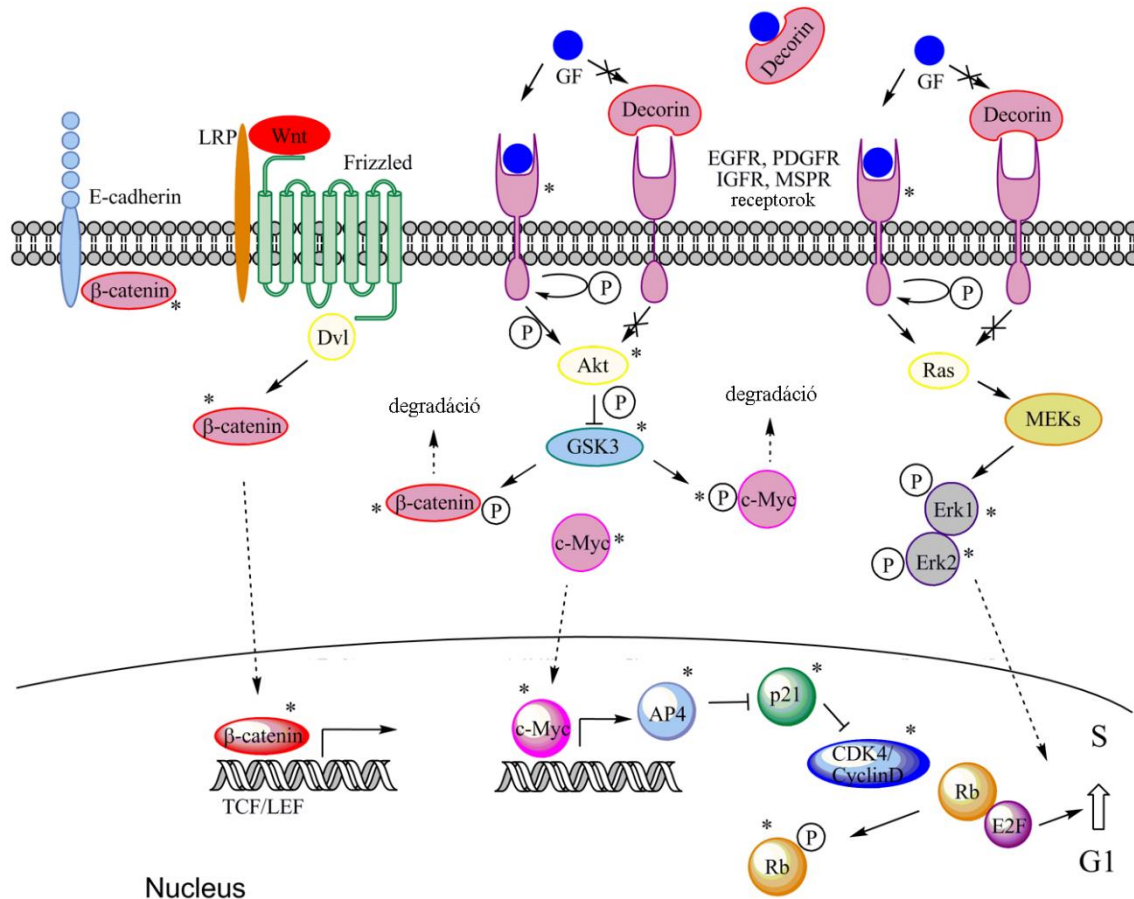


**32. ábra. Decorin hatása a PDGF jelátvitelre kísérletes májrákokban. TGFβ hatására a PDGF ligand termelődése megnövekszik. A decorin jelenléte mind a Smad-függő, mind a Smad-független TGFβ receptor szignalizációt gátolja, amely csökkent PDGF ligand expressziót eredményez. Az extracelluláris térben a decorin meggátolhatja PDGF receptorához történő kapcsolódását, amellyel gátolja a további jelátvitelt a PDGFR-ről. A PDGF autokrin és/vagy parakrin módon hathat a környezetében. MEK, mitogén aktiválta protein kináz protein kináz/ERK kináz, PLCc, foszfolipáz C gamma; TGFβRI, TGFβ receptor 1; TGFβRII, TGFβ receptor 2.**

A decorin gátolja a VEGF termelődést is a tumorsejtekben, és ezzel egyidejűleg közvetlenül blokkolja a VEGFR2-t [132]. Lehetséges, hogy a decorin ehhez hasonlóan, megakadályozza a PDGF kifejeződést, és talán közvetlenül is képes a PDGFR blokkolására a tumorokban, ezzel csökkent receptor foszforilációt kiváltva. A PDGF forrása egyelőre tisztázatlan, a ligand származhat a stroma sejteiből, amelyek aztán parakrin módon hatnak a tumorsejtekre, de ezzel párhuzamosan megtermelhetik a tumorsejtek is autokrin módon [129]. A különféle izoformák származhatnak különböző sejtektől [133]. Számos, tumormodellekkel készült tanulmány beszámolt arról, hogy a glükózaminoglikánok, mint pl. a chondroitin-szulfát, központi szerepet játszhatnak a PDGFR hatásában [134-136], és részt vehetnek az extracelluláris mátrix újrászerveződésében [137, 138]. Mindezt együttesen értékelve, lehetséges, hogy mind a decorin fehérje váza, mind annak DS/CS oldallánca képez befolyásolni a PDGF szignalizációt. További vizsgálatok szükségesek annak megállapítására, hogy a decorinnak mely része mely hatás kiváltásáért felelős.

A jelátviteli hálózatban a receptor aktivációt a Ras/MEK/ERK és a PI3K/Akt/mTOR útvonalak közvetítik, amelyek a legfőbb, és a legtöbbet tanulmányozott szignalizációs útvonalak a daganatok többségében, beleértve a HCC-t is [9, 75]. Jelentős emelkedést tapasztaltunk DEN-kezelés során az ERK1/2 foszforilációjának szintjében a decorin hiányos mintákban annak ellenére, hogy a vad típusú állatokban nem láttunk változást a kezeletlen kontrollhoz képest. Ez azt jelenti, hogy a DEN-kezelés a decorin jelenlétében nem okoz számottevő változást az ERK1/2 foszforilációban, tehát a hatás a decorin hiányának tulajdonítható. Ez volt a legszignifikánsabb különbség, amit a kísérletes modellünkben sikerült kimutatni. Mindemelett, az Akt foszforiláció is markáns emelkedést mutatott a *Dcn*<sup>-/-</sup> májtumorokban a vad típusú mintákhoz viszonyítva. Ismert, hogy az Akt foszforilált formája inaktiválja GSK3 $\beta$ -t [139, 140], ugyanakkor a GSK3 $\beta$  foszforilációjában változást nem tudtunk detektálni, amely degradációs szignálként a fehérje mennyiségének csökkenését okozná. Ezzel szemben csökkent c-Myc és  $\beta$ -catenin foszforilációt észleltünk a decorin hiányos karcinogénkezelte mintákban, amely változások utalhatnak a fokozott GSK3 $\beta$  inaktivációra [36]. A GSK3 $\beta$  olyan központi molekula, amely számos jelátviteli útvonalból származó szignált képes összekapcsolni, például a Wnt és az RTK útvonalak szignáljait. Ennek megfelelően, a fehérje aktivitása gondosan szabályozott folyamat. A Ser9-es pozícióban

történő inaktiváló foszforilációja mellett a GSK3 $\beta$  aktiváció a Thy216-os pozíció foszforilációjával növelhető. Ez az aktiváló foszforiláció gátolható EGF és inzulin ligandokkal [139]. Elképzelhető tehát, hogy a decorin hiányos májtumorokban lecsökkent GSK3 $\beta$  aktivitás az aktiváló foszforiláció gátlásának eredménye, amelyet a megemelkedett foszfo-EGFR szint okoz.



**33. ábra.** Decorin hatása a jelátviteli folyamatokra kísérletes májrákokban. Az extracelluláris térben a decorin növekedési faktorokat köthet (pl. PDGF-et) és számos tirozin kináz receptorhoz kapcsolódhat (RTK). Ezek az interakciók befolyásolják az olyan 'downstream' jelátviteli útvonalakat, mint az Akt/GSK3 $\beta$ , vagy a Ras/MEK/ERK. Az ERK1/2 változásai a decorin jelenlétében, illetve hiányában a különféle receptorok közti 'crosstalk' következménye lehet. A GSK3 $\beta$  aktivitása  $\beta$ -catenin és c-Myc degradációhoz vezet. A decorin p21<sup>WAF1/CIP1</sup> aktiváción keresztül éri el tumorszupresszor hatását. Amikor a decorin nincs jelen, a c-Myc sejtmagba történő transzlokációja AP4 expresszióhoz vezet, amely gátolja a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> génkifejeződését. Ez ahhoz vezet, hogy a CDK4 foszforilálja a retinoblasztóma fehérjét, és így végül a sejt átlendül a sejtciklus restriktív pontján az S-fázisba. GF = növekedési faktor; GSK3 = glikogén szintáz kináz 3; MEK, mitogén aktiválta protein kináz protein kináz/ERK kináz.

Kísérleteinkből az látszik, hogy a decorin tumorigenezist gátló hatása TA-kezelés során jelentősebbnek bizonyult, hiányában jóval kifejezettebb tumorfejlődést tapasztaltunk, mint a DEN-indukált májdaganatok esetén, ahol nem alakul ki cirrhosis a kezelés hatására. Az nem világos, hogy a kollagénhez kötött decorin vajon hatékonyan képes-e a sejtfelszíni receptorokhoz kapcsolódni, és ezzel beavatkozni a szignalizációs folyamatokba, vagy csak a szolubilis decorin teszi ezt, amely erre bizonyítottan képes. A cirrhotikus májban a decorin a fibrotikus septum-ok mentén halmozódik fel, valamint a tumorok körüli kötőszövetben figyelhető meg, amíg a cirrhosis nélküli, DEN-kezelt májakban jóval kevesebb decorin látható. Megjegyezendő, hogy az extracelluláris mátrix MMP-k által történő fokozott degradációja mind a fibrogenesis során [141, 142], mind a karcinogenesisben [143, 144] gyakori folyamat. Ezek fényében feltételezhető, hogy a decorin MMP működés következtében a kollagénhez kötött állapotából felszabadulhat, ami a szolubilis proteoglikán helyi felhalmozódását okozza az invazív tumor frontjában. Ha ez így van, akkor TA-kezelés során a decorin mennyisége a kötőszövetes felhalmozódás következtében eleve magasabb, mint DEN-kezelés esetén, így a szöveti koncentrációja a cirrhotikus talajon fejlődő HCC-k körül jóval magasabb, mint a cirrhosis-tól mentes májtumorok fejlődése során. Ez eredményezheti a decorin hangsúlyosabb tumornövekedés gátló hatását a TA-indukált májrákokban.

Összegezve, a decorin gén kiütése számos komplex, sejtműködést szabályozó folyamatot befolyásolt. A proteoglikán hiánya a PDGFR $\alpha$ , EGFR, RON és az IGF-IR tirozin kináz receptorok alapaktivitását megnövelte, ennek következtében pedig a sejtnövekedést támogató és a túlélést elősegítő szignálok felerősödtek a tumorokban. Vizsgálatainkban a decorin PDGFR gátló hatását a hepatokarcinogenesis során nem közvetlenül a receptoron, hanem annak PDGF AB ligandját megkötve befolyásolta. A modellrendszerünk alapján a decorint nélkülöző szöveti környezet és az ebből származó RTK aktiváció olyan körülményeket hoznak létre, amelyben a Ras/MEK/ERK útvonal tartósan aktív maradhatott. Kísérleteink során ez a jelátviteli út bizonyult a legfőbb szignáltranszdukciós útvonallnak. Mindemellett, fontos szerepet tulajdoníthatunk az Akt aktivációnak, amelyet a c-Myc és a  $\beta$ -catenin degradációjának gátlásával együtt figyeltünk meg (33. ábra). A sejtmagban, c-Myc képes az AP4 transzkripció faktor indukására, amely ismert transzkripció represszora p21<sup>WAF1/CIP1</sup> tumorsuppresszor

fehérjének. Ennek következtében a lecsökkent p21<sup>WAF1/CIP1</sup> szint már nem lesz elegendő a CDK4/Ciklin4 komplex gátlására, amely a retinoblasztóma fehérje foszforilálásán keresztül E2F felszabadulást okoz, ennek eredménye pedig, hogy a sejt keresztülhaladhat a G1 fázis restrikciós pontján (33. ábra).

Összefoglalva, vizsgálataink új adatokkal szolgálnak a decorin májdaganat progressziójának gátlásában betöltött szerepét illetően, és mechanisztikus jellemzést nyújtanak annak *in vitro* és *in vivo* biológiai aktivitására. Eredményeink támogatják az elképzelést, miszerint a decorin valamely formája önmagában, vagy más szerekkel kombinálva felhasználhatóvá válhat a tumorterápiában [35, 37, 45]. Annak ténye, hogy a decorin természetes, biológiai fehérjetermék, amely emiatt nem immunogén, célzott bejuttatással, és/vagy expresszióval történő felhasználása a tumorokkal folytatott küzdelemben ésszerű lehetőségnek tűnik [37, 74, 145, 146].

## VI. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A decorin a különféle sejttípusokban eltérő jelátviteli útvonalakon keresztül képes kifejteni tumorszupresszor hatását.
  - a. a decorin a G1 fázis blokkját képes okozni a sejtciklusban a p21<sup>WAF1/CIP1</sup> indukcióján keresztül
  - b. ahogy a Hep3B sejtekben láthattuk, G2 fázis blokkot is előidézhethet, ha a körülmények ezt teszik lehetővé
2. A decorin hiánya az indukált hepatokarcinogenezis során kedvez a tumor progressziónak. A decorin hiányos állatokban mindkét modellünk esetén nagyobb számú és térfogatú májdaganat alakult ki a vad típussal összehasonlítva és ez a különbség a TA kezelt állatokban kifejezettebb volt.
3. A TA kezelt állatokban a decorin jelenléte vagy hiánya főleg a RTK/Ras/MAPK útvonalat befolyásolta, míg a DEN kezelt állatokban a  $\beta$ -catenin szerepe volt inkább kifejezett.
4. A decorin hiánya konstitutívan aktív tirozin kináz receptorokat eredményez, amelyek közül a decorin lehetséges célpontjaként a MSPR/RON receptort korábban még nem azonosították.
5. A PDGFR $\alpha$  receptoraktivációt a decorin valószínűleg nem közvetlenül gátolja, hanem annak ligandjának megkötésével, így megakadályozza, hogy a PDGF a receptorához kapcsolódhasson.



## VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A májrák az egyik leggyorsabban terjedő daganattípus világszerte. Az esetek többségében krónikus gyulladás okozta fibrosis vagy cirrhosis áll a tumor kialakulásának hátterében. Malignus transzformáció során a tumor mikrokörnyezete olyan minőségi és mennyiségi változásokon megy keresztül, amelyek befolyásolják a tumorsejtek viselkedését. A decorin egy kisméretű leucinban gazdag proteoglikán, az extracelluláris mártix egyik eleme, amely gátolni képes a tumorfejlődés folyamatait egyes tirozin kináz receptorok (EGFR, Met, IGF-IR, vagy PDGFR) blokkolásával.

*In vitro* és *in vivo* kísérleti rendszereken vizsgáltuk a jelátviteli folyamatokat. Négyféle, különböző molekuláris háttérrel rendelkező hepatóma sejtvonalat tanulmányoztunk (a HepG2-t, a Hep3B-t, a HuH7-et, és a HLE-t). Eredményeink igazolták a decorin potenciális növekedésgátló hatását mindegyik sejtvonalon. A decorin által kiváltott jól ismert p21<sup>WAF1/CIP1</sup> indukcióját, a c-Myc és  $\beta$ -catenin inaktiváló foszforilációját, és az EGFR, GSK3 $\beta$  és ERK1/2 foszforilációjának csökkenését figyeltük meg a HepG2 sejteken. Ugyanakkor a többi sejtvonalon ettől eltérő, új mechanizmusokat tártunk fel, például a Hep3B esetében a decorin által G2 fázisban okozott sejtciklus blokkot.

Az állatkísérleteinkben tioacetamid és dietil-nitrózamin által előidézett hepatokarcinogenezis modelleket használtunk. A decorin hiányos állapot megnövelte a tumorkialakulás gyakoriságát a vad típusú állatokhoz képest. Ez összhangban volt a lecsökkent p21<sup>WAF1/CIP1</sup> szintjével. Emellett kimutattuk, hogy a decorin hiányos állapot a decorin három olyan, ismert RTK célpontjának állandó aktivációját okozza, mint a PDGFR $\alpha$ , EGFR, IGF-IR valamint, ezen felül egy új, negyedik célpontot, a MSPR/RON-t is azonosítottunk. Az PDGFR jelátvitel gátlása valószínűleg a PDGF ligand megkötésén keresztül valósul meg.

Vizsgálataink során összességében azt találtuk, hogy a decorin jelentős szerepet játszik a hepatokarcinogenezis kialakulásának és progressziójának gátlásában *in vitro* és *in vivo*. Ennek megfelelően, eredményeink alátámasztják a decorin terápiás felhasználásának lehetőségét.

## VIII. SUMMARY

Hepatocellular carcinoma represents one of the most-rapidly spreading cancers in the world. In the majority of cases, an inflammation-driven fibrosis or cirrhosis precedes the development of the tumor. During malignant transformation, the tumor microenvironment undergoes qualitative and quantitative changes that modulate the behavior of the malignant cells. Decorin, a small leucine rich proteoglycan, member of the extracellular matrix, known to interfere with cellular events of tumorigenesis mainly by blocking various receptor tyrosine kinases (RTK) such as EGFR, Met, IGF-IR, and PDGFR.

In this study, we characterized cell signaling events in *in vitro* and *in vivo* experimental systems. Hepatoma cell lines HepG2, Hep3B, HuH7 and HLE with different molecular background and differentiatonal status were observed *in vitro*. Our results proved the inhibitory potential of decorin on all hepatoma cell lines. Induction of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> (which is a well-known proliferation inhibitory target of decorin), increase in c-Myc and  $\beta$ -catenin inactivating phosphorylation and decrease of EGFR, GSK3 $\beta$  and ERK1/2 phosphorylation were observed in HepG2 cells. However, other cell lines showed alternative molecular mechanisms, for instance decorin caused G2 phase blockage in case of Hep3B cells.

Two experimental models of hepatocarcinogenesis were used applying thioacetamide or diethyl nitrosamine as carcinogens in animal experiments. Genetic ablation of decorin led to enhanced tumor occurrence as compared to wild-type mice. These findings correlated with decreased levels of the cyclin dependent kinase inhibitor p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. In addition, we discovered that in a genetic background lacking decorin, four RTKs were constitutively activated (phosphorylated), including three known targets of decorin such as PDGFR $\alpha$ , EGFR, IGF-IR, and a novel RTK MSPR/RON. Furthermore, we found that decorin binds to PDGF rather than the receptor itself.

Our findings provide powerful genetic evidence for a crucial inhibitory role of decorin during hepatocarcinogenesis *in vitro* and *in vivo*. Thus, our results support future utilization of decorin as an antitumor agent in liver cancer.

## IX. IRODALOMJEGYZÉK

1. Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. (2014) Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 28: 753-770.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 136: E359-386.
3. Center MM, Jemal A. (2011) International trends in liver cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 20: 2362-2368.
4. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 63: 11-30.
5. De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R, Group E-W. (2014) Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EURO CARE--5-a population-based study. *Lancet Oncol.* 15: 23-34.
6. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55: 74-108.
7. Wong CM, Ng IO. (2008) Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 28: 160-174.
8. Lachenmayer A, Alsinet C, Chang CY, Llovet JM. (2010) Molecular approaches to treatment of hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 42 Suppl 3: S264-272.
9. Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL, Llovet JM. (2007) Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 27: 55-76.
10. Monga SP. (2015) beta-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology.* 148: 1294-1310.
11. Huber AH, Weis WI. (2001) The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell.* 105: 391-402.
12. Giles RH, van Es JH, Clevers H. (2003) Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1653: 1-24.

13. Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. (2003) Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol.* 18: 280-287.
14. Hsu HC, Jeng YM, Mao TL, Chu JS, Lai PL, Peng SY. (2000) Beta-catenin mutations are associated with a subset of low-stage hepatocellular carcinoma negative for hepatitis B virus and with favorable prognosis. *Am J Pathol.* 157: 763-770.
15. Kondo Y, Kanai Y, Sakamoto M, Genda T, Mizokami M, Ueda R, Hirohashi S. (1999) Beta-catenin accumulation and mutation of exon 3 of the beta-catenin gene in hepatocellular carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 90: 1301-1309.
16. Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. (2016) Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev.* 97: 4-27.
17. Pickup MW, Mouw JK, Weaver VM. (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Rep.* 15: 1243-1253.
18. Barash H, E RG, Edrei Y, Ella E, Israel A, Cohen I, Corchia N, Ben-Moshe T, Pappo O, Pikarsky E, Goldenberg D, Shiloh Y, Galun E, Abramovitch R. (2010) Accelerated carcinogenesis following liver regeneration is associated with chronic inflammation-induced double-strand DNA breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 2207-2212.
19. Tahmasebi Birgani M, Carloni V. (2017) Tumor Microenvironment, a Paradigm in Hepatocellular Carcinoma Progression and Therapy. *Int J Mol Sci.* 18.
20. Baghy K, Tatrai P, Regos E, Kovalszky I. (2016) Proteoglycans in liver cancer. *World J Gastroenterol.* 22: 379-393.
21. Hardingham TE, Fosang AJ. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 6: 861-870.
22. Iozzo RV. (1997) The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 32: 141-174.
23. Seidler DG, Dreier R. (2008) Decorin and its galactosaminoglycan chain: extracellular regulator of cellular function? *IUBMB Life.* 60: 729-733.

24. Krusius T, Ruoslahti E. (1986) Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83: 7683-7687.
25. Ruoslahti E. (1988) Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*. 4: 229-255.
26. Weber IT, Harrison RW, Iozzo RV. (1996) Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*. 271: 31767-31770.
27. Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE, Iozzo RV. (1997) Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*. 136: 729-743.
28. Zhang G, Chen S, Goldoni S, Calder BW, Simpson HC, Owens RT, McQuillan DJ, Young MF, Iozzo RV, Birk DE. (2009) Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J Biol Chem*. 284: 8888-8897.
29. Zhang G, Ezura Y, Chervoneva I, Robinson PS, Beason DP, Carine ET, Soslowsky LJ, Iozzo RV, Birk DE. (2006) Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J Cell Biochem*. 98: 1436-1449.
30. Jarvelainen H, Puolakkainen P, Pakkanen S, Brown EL, Hook M, Iozzo RV, Sage EH, Wight TN. (2006) A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair Regen*. 14: 443-452.
31. Haruyama N, Sreenath TL, Suzuki S, Yao X, Wang Z, Wang Y, Honeycutt C, Iozzo RV, Young MF, Kulkarni AB. (2009) Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization. *Matrix Biol*. 28: 129-136.
32. Grant DS, Yenisey C, Rose RW, Tootell M, Santra M, Iozzo RV. (2002) Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene*. 21: 4765-4777.
33. Merline R, Moreth K, Beckmann J, Nastase MV, Zeng-Brouwers J, Tralhao JG, Lemarchand P, Pfeilschifter J, Schaefer RM, Iozzo RV, Schaefer L. (2011) Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and MicroRNA-21. *Sci Signal*. 4: ra75.

34. Baghy K, Dezso K, Laszlo V, Fullar A, Peterfia B, Paku S, Nagy P, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. (2011) Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice. *Lab Invest.* 91: 439-451.
35. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2012) Decorin: a guardian from the matrix. *Am J Pathol.* 181: 380-387.
36. Iozzo RV, Sanderson RD. (2011) Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 15: 1013-1031.
37. Theocharis AD, Skandalis SS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. (2010) Proteoglycans in health and disease: novel roles for proteoglycans in malignancy and their pharmacological targeting. *FEBS J.* 277: 3904-3923.
38. Iozzo RV, Chakrani F, Perrotti D, McQuillan DJ, Skorski T, Calabretta B, Eichstetter I. (1999) Cooperative action of germ-line mutations in decorin and p53 accelerates lymphoma tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96: 3092-3097.
39. Bi X, Pohl NM, Qian Z, Yang GR, Gou Y, Guzman G, Kajdacsy-Balla A, Iozzo RV, Yang W. (2012) Decorin-mediated inhibition of colorectal cancer growth and migration is associated with E-cadherin in vitro and in mice. *Carcinogenesis.* 33: 326-330.
40. Bi X, Tong C, Dockendorff A, Bancroft L, Gallagher L, Guzman G, Iozzo RV, Augenlicht LH, Yang W. (2008) Genetic deficiency of decorin causes intestinal tumor formation through disruption of intestinal cell maturation. *Carcinogenesis.* 29: 1435-1440.
41. Santra M, Mann DM, Mercer EW, Skorski T, Calabretta B, Iozzo RV. (1997) Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest.* 100: 149-157.
42. Biaoxue R, Xiguang C, Hua L, Hui M, Shuanying Y, Wei Z, Wenli S, Jie D. (2011) Decreased expression of decorin and p57(KIP2) correlates with poor survival and lymphatic metastasis in lung cancer patients. *Int J Biol Markers.* 26: 9-21.

43. Goldoni S, Seidler DG, Heath J, Fassan M, Baffa R, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. (2008) An antimetastatic role for decorin in breast cancer. *Am J Pathol.* 173: 844-855.
44. Hu Y, Sun H, Owens RT, Wu J, Chen YQ, Berquin IM, Perry D, O'Flaherty JT, Edwards IJ. (2009) Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia.* 11: 1042-1053.
45. Reed CC, Waterhouse A, Kirby S, Kay P, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. (2005) Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene.* 24: 1104-1110.
46. Shintani K, Matsumine A, Kusuzaki K, Morikawa J, Matsubara T, Wakabayashi T, Araki K, Satonaka H, Wakabayashi H, Iino T, Uchida A. (2008) Decorin suppresses lung metastases of murine osteosarcoma. *Oncol Rep.* 19: 1533-1539.
47. Troup S, Njue C, Kliwer EV, Parisien M, Roskelley C, Chakravarti S, Roughley PJ, Murphy LC, Watson PH. (2003) Reduced expression of the small leucine-rich proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 9: 207-214.
48. Santra M, Eichstetter I, Iozzo RV. (2000) An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem.* 275: 35153-35161.
49. Reed CC, Gauldie J, Iozzo RV. (2002) Suppression of tumorigenicity by adenovirus-mediated gene transfer of decorin. *Oncogene.* 21: 3688-3695.
50. Tralhao JG, Schaefer L, Micegova M, Evaristo C, Schonherr E, Kayal S, Veiga-Fernandes H, Danel C, Iozzo RV, Kresse H, Lemarchand P. (2003) In vivo selective and distant killing of cancer cells using adenovirus-mediated decorin gene transfer. *FASEB J.* 17: 464-466.
51. Santra M, Skorski T, Calabretta B, Lattime EC, Iozzo RV. (1995) De novo decorin gene expression suppresses the malignant phenotype in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 7016-7020.
52. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature.* 346: 281-284.

53. Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I. (1999) Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 274: 4489-4492.
54. De Luca A, Santra M, Baldi A, Giordano A, Iozzo RV. (1996) Decorin-induced growth suppression is associated with up-regulation of p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem.* 271: 18961-18965.
55. Moscatello DK, Santra M, Mann DM, McQuillan DJ, Wong AJ, Iozzo RV. (1998) Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest.* 101: 406-412.
56. Zhu JX, Goldoni S, Bix G, Owens RT, McQuillan DJ, Reed CC, Iozzo RV. (2005) Decorin evokes protracted internalization and degradation of the epidermal growth factor receptor via caveolar endocytosis. *J Biol Chem.* 280: 32468-32479.
57. Schonherr E, Sunderkotter C, Iozzo RV, Schaefer L. (2005) Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem.* 280: 15767-15772.
58. Goldoni S, Humphries A, Nystrom A, Sattar S, Owens RT, McQuillan DJ, Ireton K, Iozzo RV. (2009) Decorin is a novel antagonistic ligand of the Met receptor. *J Cell Biol.* 185: 743-754.
59. Cabello-Verrugio C, Brandan E. (2007) A novel modulatory mechanism of transforming growth factor-beta signaling through decorin and LRP-1. *J Biol Chem.* 282: 18842-18850.
60. Fiedler LR, Schonherr E, Waddington R, Niland S, Seidler DG, Aeschlimann D, Eble JA. (2008) Decorin regulates endothelial cell motility on collagen I through activation of insulin-like growth factor I receptor and modulation of alpha2beta1 integrin activity. *J Biol Chem.* 283: 17406-17415.
61. Bozoky B, Savchenko A, Guven H, Ponten F, Klein G, Szekely L. (2014) Decreased decorin expression in the tumor microenvironment. *Cancer Med.* 3: 485-491.
62. Iozzo RV, Buraschi S, Genua M, Xu SQ, Solomides CC, Peiper SC, Gomella LG, Owens RC, Morrione A. (2011) Decorin antagonizes IGF receptor I (IGF-IR) function by interfering with IGF-IR activity and attenuating downstream signaling. *J Biol Chem.* 286: 34712-34721.



63. Buraschi S, Neill T, Owens RT, Iniguez LA, Purkins G, Vadigepalli R, Evans B, Schaefer L, Peiper SC, Wang ZX, Iozzo RV. (2012) Decorin protein core affects the global gene expression profile of the tumor microenvironment in a triple-negative orthotopic breast carcinoma xenograft model. *PLoS One*. 7: e45559.
64. Xu W, Neill T, Yang Y, Hu Z, Cleveland E, Wu Y, Hutten R, Xiao X, Stock SR, Shevrin D, Kaul K, Brendler C, Iozzo RV, Seth P. (2015) The systemic delivery of an oncolytic adenovirus expressing decorin inhibits bone metastasis in a mouse model of human prostate cancer. *Gene Ther*. 22: 247-256.
65. Bi XL, Yang W. (2013) Biological functions of decorin in cancer. *Chin J Cancer*. 32: 266-269.
66. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2015) Oncosuppressive functions of decorin. *Mol Cell Oncol*. 2: e975645.
67. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. (2009) Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol*. 90: 367-386.
68. Becker FF. (1983) Thioacetamide hepatocarcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 71: 553-558.
69. Camus-Randon AM, Raffalli F, Bereziat JC, McGregor D, Konstandi M, Lang MA. (1996) Liver injury and expression of cytochromes P450: evidence that regulation of CYP2A5 is different from that of other major xenobiotic metabolizing CYP enzymes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 138: 140-148.
70. Chen B, Sirota M, Fan-Minogue H, Hadley D, Butte AJ. (2015) Relating hepatocellular carcinoma tumor samples and cell lines using gene expression data in translational research. *BMC Med Genomics*. 8 Suppl 2: S5.
71. Baghy K, Iozzo RV, Kovalszky I. (2012) Decorin-TGFbeta axis in hepatic fibrosis and cirrhosis. *J Histochem Cytochem*. 60: 262-268.
72. McBain AL, Mann DM. (2001) Purification of recombinant human decorin and its subdomains. *Methods Mol Biol*. 171: 221-229.
73. Neill T, Schaefer L, Iozzo RV. (2016) Decorin as a multivalent therapeutic agent against cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 97: 174-185.
74. Sofeu Feugaing DD, Gotte M, Viola M. (2013) More than matrix: the multifaceted role of decorin in cancer. *Eur J Cell Biol*. 92: 1-11.

75. Whittaker S, Marais R, Zhu AX. (2010) The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 29: 4989-5005.
76. Zhang Y, Wang Y, Du Z, Wang Q, Wu M, Wang X, Wang L, Cao L, Hamid AS, Zhang G. (2012) Recombinant human decorin suppresses liver HepG2 carcinoma cells by p21 upregulation. *Onco Targets Ther*. 5: 143-152.
77. Hamid AS, Li J, Wang Y, Wu X, Ali HA, Du Z, Bo L, Zhang Y, Zhang G. (2013) Recombinant human decorin upregulates p57KIP(2) expression in HepG2 hepatoma cell lines. *Mol Med Rep*. 8: 511-516.
78. Santra M, Reed CC, Iozzo RV. (2002) Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem*. 277: 35671-35681.
79. Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. (2005) Erk associates with and primes GSK-3 $\beta$  for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol Cell*. 19: 159-170.
80. Wu D, Pan W. (2010) GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem Sci*. 35: 161-168.
81. Soussi T, Wiman KG. (2015) TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ*. 22: 1239-1249.
82. Liu J, Zhang C, Hu W, Feng Z. (2015) Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett*. 356: 197-203.
83. Kung CP, Murphy ME. (2016) The role of the p53 tumor suppressor in metabolism and diabetes. *J Endocrinol*. 231: R61-R75.
84. Werner H, Sarfstein R, LeRoith D, Bruchim I. (2016) Insulin-like Growth Factor 1 Signaling Axis Meets p53 Genome Protection Pathways. *Front Oncol*. 6: 159.
85. Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lecluse Y, Housset C, Lacombe ML, Desbois-Mouthon C. (2005) Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 167: 869-877.
86. Morrione A, Neill T, Iozzo RV. (2013) Dichotomy of decorin activity on the insulin-like growth factor-I system. *FEBS J*. 280: 2138-2149.

87. Yu H, Rohan T. (2000) Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 92: 1472-1489.
88. Mitry RR, Sarraf CE, Wu CG, Pignatelli M, Habib NA. (1997) Wild-type p53 induces apoptosis in Hep3B through up-regulation of bax expression. *Lab Invest.* 77: 369-378.
89. Xiong L, Kou F, Yang Y, Wu J. (2007) A novel role for IGF-1R in p53-mediated apoptosis through translational modulation of the p53-Mdm2 feedback loop. *J Cell Biol.* 178: 995-1007.
90. Yoon AR, Hong J, Yun CO. (2017) Adenovirus-mediated decorin expression induces cancer cell death through activation of p53 and mitochondrial apoptosis. *Oncotarget.* 8: 76666-76685.
91. Benada J, Macurek L. (2015) Targeting the Checkpoint to Kill Cancer Cells. *Biomolecules.* 5: 1912-1937.
92. Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. (2012) c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res.* 18: 5546-5553.
93. Sheridan C, Brumatti G, Elgendy M, Brunet M, Martin SJ. (2010) An ERK-dependent pathway to Noxa expression regulates apoptosis by platinum-based chemotherapeutic drugs. *Oncogene.* 29: 6428-6441.
94. Tsukada Y, Miyazawa K, Kitamura N. (2001) High intensity ERK signal mediates hepatocyte growth factor-induced proliferation inhibition of the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *J Biol Chem.* 276: 40968-40976.
95. Dor I, Namba M, Sato J. (1975) Establishment and some biological characteristics of human hepatoma cell lines. *Gan.* 66: 385-392.
96. Hausser H, Witt O, Kresse H. (1993) Influence of membrane-associated heparan sulfate on the internalization of the small proteoglycan decorin. *Exp Cell Res.* 208: 398-406.
97. Schaefer L, Hausser H, Altenburger M, Ugorcakova J, August C, Fisher LW, Schaefer RM, Kresse H. (1998) Decorin, biglycan and their endocytosis receptor in rat renal cortex. *Kidney Int.* 54: 1529-1541.
98. Dituri F, Mazzocca A, Fernando J, Papappicco P, Fabregat I, De Santis F, Paradiso A, Sabba C, Giannelli G. (2013) Differential Inhibition of the TGF-beta Signaling Pathway in HCC Cells Using the Small Molecule Inhibitor

- LY2157299 and the D10 Monoclonal Antibody against TGF-beta Receptor Type II. *PLoS One*. 8: e67109.
99. Dzieran J, Fabian J, Feng T, Coulouarn C, Ilkavets I, Kyselova A, Breuhahn K, Dooley S, Meindl-Beinker NM. (2013) Comparative analysis of TGF-beta/Smad signaling dependent cytostasis in human hepatocellular carcinoma cell lines. *PLoS One*. 8: e72252.
  100. Loeppen S, Schneider D, Gaunitz F, Gebhardt R, Kurek R, Buchmann A, Schwarz M. (2002) Overexpression of glutamine synthetase is associated with beta-catenin-mutations in mouse liver tumors during promotion of hepatocarcinogenesis by phenobarbital. *Cancer Res*. 62: 5685-5688.
  101. Dahmani R, Just PA, Perret C. (2011) The Wnt/beta-catenin pathway as a therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 35: 709-713.
  102. Bertino G, Ardiri A, Malaguarnera M, Malaguarnera G, Bertino N, Calvagno GS. (2012) Hepatocellular carcinoma serum markers. *Semin Oncol*. 39: 410-433.
  103. Lee JS, Thorgeirsson SS. (2002) Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer. *Hepatology*. 35: 1134-1143.
  104. Li Y, Liu Y, Xia W, Lei D, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2013) Age-dependent alterations of decorin glycosaminoglycans in human skin. *Sci Rep*. 3: 2422.
  105. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75: 805-816.
  106. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 6: 387-400.
  107. Buraschi S, Pal N, Tyler-Rubinstein N, Owens RT, Neill T, Iozzo RV. (2010) Decorin antagonizes Met receptor activity and down-regulates {beta}-catenin and Myc levels. *J Biol Chem*. 285: 42075-42085.
  108. Jain S, Singhal S, Lee P, Xu R. (2010) Molecular genetics of hepatocellular neoplasia. *Am J Transl Res*. 2: 105-118.

109. Rivadeneira DB, Mayhew CN, Thangavel C, Sotillo E, Reed CA, Grana X, Knudsen ES. (2010) Proliferative suppression by CDK4/6 inhibition: complex function of the retinoblastoma pathway in liver tissue and hepatoma cells. *Gastroenterology*. 138: 1920-1930.
110. Lu JW, Lin YM, Chang JG, Yeh KT, Chen RM, Tsai JJ, Su WW, Hu RM. (2013) Clinical implications of deregulated CDK4 and Cyclin D1 expression in patients with human hepatocellular carcinoma. *Med Oncol*. 30: 379.
111. Jung P, Hermeking H. (2009) The c-MYC-AP4-p21 cascade. *Cell Cycle*. 8: 982-989.
112. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 281: 1509-1512.
113. Danilkovitch-Miagkova A, Miagkov A, Skeel A, Nakaigawa N, Zbar B, Leonard EJ. (2001) Oncogenic mutants of RON and MET receptor tyrosine kinases cause activation of the beta-catenin pathway. *Mol Cell Biol*. 21: 5857-5868.
114. Hu T, Li C. (2010) Convergence between Wnt-beta-catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol Cancer*. 9: 236.
115. Csordas G, Santra M, Reed CC, Eichstetter I, McQuillan DJ, Gross D, Nugent MA, Hajnoczky G, Iozzo RV. (2000) Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin. A mechanism for controlling tumor growth in vivo. *J Biol Chem*. 275: 32879-32887.
116. Baghy K, Horvath Z, Regos E, Kiss K, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. (2013) Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis. *FEBS J*. 280: 2150-2164.
117. Stock P, Monga D, Tan X, Micsenyi A, Loizos N, Monga SP. (2007) Platelet-derived growth factor receptor-alpha: a novel therapeutic target in human hepatocellular cancer. *Mol Cancer Ther*. 6: 1932-1941.
118. Berasain C, Perugorria MJ, Latasa MU, Castillo J, Goni S, Santamaria M, Prieto J, Avila MA. (2009) The epidermal growth factor receptor: a link between inflammation and liver cancer. *Exp Biol Med (Maywood)*. 234: 713-725.

119. Oseini AM, Roberts LR. (2009) PDGFRalpha: a new therapeutic target in the treatment of hepatocellular carcinoma? *Expert Opin Ther Targets*. 13: 443-454.
120. Wu J, Zhu AX. (2011) Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol*. 4: 30.
121. Sengupta B, Siddiqi SA. (2012) Hepatocellular carcinoma: important biomarkers and their significance in molecular diagnostics and therapy. *Curr Med Chem*. 19: 3722-3729.
122. Chen XH, Li ZQ, Peng H, Jin SM, Fu HQ, Zhu TC, Weng XG. (2013) Type 1 insulin-like growth factor receptor monoclonal antibody (HX-1162) treatment for liver cancer. *Onco Targets Ther*. 6: 527-530.
123. Chen Q, Seol DW, Carr B, Zarnegar R. (1997) Co-expression and regulation of Met and Ron proto-oncogenes in human hepatocellular carcinoma tissues and cell lines. *Hepatology*. 26: 59-66.
124. Cho SB, Park YL, Song YA, Kim KY, Lee GH, Cho DH, Myung DS, Park KJ, Lee WS, Chung IJ, Choi SK, Kim KK, Joo YE. (2011) Small interfering RNA-directed targeting of RON alters invasive and oncogenic phenotypes of human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep*. 26: 1581-1586.
125. Loizos N, Xu Y, Huber J, Liu M, Lu D, Finnerty B, Rolser R, Malikzay A, Persaud A, Corcoran E, Deevi DS, Balderes P, Bassi R, Jimenez X, Joynes CJ, Mangalampalli VR, Steiner P, Tonra JR, Wu Y, Pereira DS, Zhu Z, Ludwig DL, Hicklin DJ, Bohlen P, Witte L, Kussie P. (2005) Targeting the platelet-derived growth factor receptor alpha with a neutralizing human monoclonal antibody inhibits the growth of tumor xenografts: implications as a potential therapeutic target. *Mol Cancer Ther*. 4: 369-379.
126. LaRochelle WJ, Jensen RA, Heidaran MA, May-Siroff M, Wang LM, Aaronson SA, Pierce JH. (1993) Inhibition of platelet-derived growth factor autocrine growth stimulation by a monoclonal antibody to the human alpha platelet-derived growth factor receptor. *Cell Growth Differ*. 4: 547-553.
127. Nili N, Cheema AN, Giordano FJ, Barolet AW, Babaei S, Hickey R, Eskandarian MR, Smeets M, Butany J, Pasterkamp G, Strauss BH. (2003) Decorin inhibition of PDGF-stimulated vascular smooth muscle cell function:

- potential mechanism for inhibition of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. *Am J Pathol.* 163: 869-878.
128. Rydziel S, Canalis E. (1996) Expression and growth factor regulation of platelet-derived growth factor B transcripts in primary osteoblast cell cultures. *Endocrinology.* 137: 4115-4119.
  129. Gotzmann J, Fischer AN, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, Jechlinger M, Waerner T, Weith A, Beug H, Mikulits W. (2006) A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene.* 25: 3170-3185.
  130. Finlay GA, Hunter DS, Walker CL, Paulson KE, Fanburg BL. (2003) Regulation of PDGF production and ERK activation by estrogen is associated with TSC2 gene expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 285: C409-418.
  131. Reis M, Czupalla CJ, Ziegler N, Devraj K, Zinke J, Seidel S, Heck R, Thom S, Macas J, Bockamp E, Fruttiger M, Taketo MM, Dimmeler S, Plate KH, Liebner S. (2012) Endothelial Wnt/beta-catenin signaling inhibits glioma angiogenesis and normalizes tumor blood vessels by inducing PDGF-B expression. *J Exp Med.* 209: 1611-1627.
  132. Khan GA, Girish GV, Lala N, Di Guglielmo GM, Lala PK. (2011) Decorin is a novel VEGFR-2-binding antagonist for the human extravillous trophoblast. *Mol Endocrinol.* 25: 1431-1443.
  133. Breitkopf K, Roeyen C, Sawitza I, Wickert L, Floege J, Gressner AM. (2005) Expression patterns of PDGF-A, -B, -C and -D and the PDGF-receptors alpha and beta in activated rat hepatic stellate cells (HSC). *Cytokine.* 31: 349-357.
  134. Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tsegenidis T, Karousou E, Theocharis AD, Pavao MS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. (2012) Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* 279: 1177-1197.
  135. Fthenou E, Zafiropoulos A, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. (2008) Chondroitin sulfate prevents platelet derived growth factor-mediated phosphorylation of PDGF-Rbeta in normal human fibroblasts severely impairing mitogenic responses. *J Cell Biochem.* 103: 1866-1876.
  136. Berdiaki A, Zafiropoulos A, Fthenou E, Katonis P, Tsatsakis A, Karamanos NK, Tzanakakis GN. (2008) Regulation of hyaluronan and versican deposition by

- growth factors in fibrosarcoma cell lines. *Biochim Biophys Acta*. 1780: 194-202.
137. Ruhland C, Schonherr E, Robenek H, Hansen U, Iozzo RV, Bruckner P, Seidler DG. (2007) The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J*. 274: 4246-4255.
  138. Schaefer L, Iozzo RV. (2012) Small leucine-rich proteoglycans, at the crossroad of cancer growth and inflammation. *Curr Opin Genet Dev*. 22: 56-57.
  139. Grimes CA, Jope RS. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol*. 65: 391-426.
  140. Jacobs KM, Bhawe SR, Ferraro DJ, Jaboin JJ, Hallahan DE, Thotala D. (2012) GSK-3beta: A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. *Int J Cell Biol*. 2012: 930710.
  141. Dudas J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, Mehde M, Neubauer K, Szalay F, Ramadori G. (2001) Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol*. 115: 725-735.
  142. Guo J, Friedman SL. (2007) Hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis*. 27: 413-426.
  143. Okazaki I, Inagaki Y. (2012) Novel strategies for hepatocellular carcinoma based on MMPs science. *Anticancer Agents Med Chem*. 12: 753-763.
  144. Lempinen M, Lyytinen I, Nordin A, Tervahartiala T, Makisalo H, Sorsa T, Isoniemi H. (2013) Prognostic value of serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in patients with hepatocellular carcinoma. *Ann Med*. 45: 482-487.
  145. Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, McQuillan DJ, Iozzo RV. (2006) Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem*. 281: 26408-26418.
  146. Iozzo RV, Karamanos N. (2010) Proteoglycans in health and disease: emerging concepts and future directions. *FEBS J*. 277: 3863.



## X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

1. Baghy K, Horvath Z, Regos E, Kiss K, Schaff Z, Iozzo RV, Kovalszky I. (2013) Decorin interferes with platelet-derived growth factor receptor signaling in experimental hepatocarcinogenesis. *FEBS J.* 280: 2150-2164.
2. Horvath Z, Kovalszky I, Fullar A, Kiss K, Schaff Z, Iozzo RV, Baghy K. (2014) Decorin deficiency promotes hepatic carcinogenesis. *Matrix Biol.* 35: 194-205.
3. Horvath Z, Reszegi A, Szilak L, Kovalszky I, Baghy K. (2018) Tumorspecific inhibitory action of decorin on different hepatoma cell lines. *BMC Cancer*, Submitted.

## XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik munkámhoz útmutatásaikkal és segítségükkel hozzájárultak. Első helyen szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek, **Dr. Baghy Kornéliának**, a TDK és PhD munkám éve alatt nyújtott felbecsülhetetlen értékű szakmai és emberi segítségért, a soha nem fogyó türelemért és bizalomért. Köszönöm továbbá **Dr. Kovalszky Ilonának**, aki témavezetőmhöz hasonló odaadással irányította munkámat és lehetőséget adott a laboratóriumában, hogy a munkámat végezhessem. Köszönöm **Dr. Matolcsy András** egyetemi tanárnak az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet jelenlegi vezetőjének, amiért munkámat lehetővé tette, és támogató figyelemmel kísérte. Köszönöm **Dr. Renato V. Iozzo**-nak, hogy rendelkezésünkre bocsátotta a decorin knockout egereket. Hálával tartozom az Állatház dolgozóinak, név szerint **Sztodola Andrásnak** és **Borza Mónikának**, az állatkísérletek kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségükért és odaadó munkájukért. Külön köszönet illeti **dr. Kiss Katalint**, **Egedi Krisztinát** és **Oláhné Nagy Júliát** a módszerek elsajátításában, kivitelezésében és az eredmények értékelésében nyújtott elengedhetetlen segítségükért és baráti támogatásukért.

Köszönöm a jelenleg hivatalos nevén **Molekuláris Patológiának** nevezett, ám tradicionálisan mindenki által csak **Biokémia** laborként ismert laboratórium minden volt és jelenlegi munkatársának, közvetlen munkatársaimnak, név szerint: **Dr. Péterfia Bálintnak**, **Dr. Fullár Alexandrának**, **Csorba Gézáné Maricának**, **Dr. Hollósi Péternek**, **Császár Krisztinának**, **Rada Kristófnak**, **Reszegi Andreának** és **Dr. Jeney András professzor úrnak**, akik munkám elvégzéséhez segítő baráti légkört teremtettek. Az említetteken kívül köszönet illeti az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet minden tagját, hogy munkámat maximális segítőkészségüket élvezve végezhettem.

Végezetül hadd fejezzem ki hálámat és szeretetemet édesanyámnak, **Horváth Lászlónénak**, édesapámnak, **Horváth Lászlónak**, testvéremnek, **Horváth Péternek**, páromnak **dr. Mihály Kingának**, valamint minden kedves családtagomnak és barátomnak a szeretetükért, az odaadásukért, a támogatásukért, a belém vetett hitükért és bizalmukért.